

Recebido em 11 de Janeiro de 2001

Enraizamento adventício *in vitro*: activação do ciclo celular

CLÉLIA NEVES ⁽¹⁾

SARA AMÂNCIO ⁽²⁾

RESUMO

A micropropagação de espécies lenhosas permite a clonagem de exemplares adultos cuja propagação vegetativa é difícil ou mesmo impossível através de técnicas tradicionais. Para a maioria das espécies lenhosas com interesse económico os sucessos alcançados pela aplicação em larga escala de técnicas de micropropagação têm sido reduzidos. Tal facto deve-se sobretudo à dificuldade de enraizar clones propagados de árvores adultas.

Uma das fases cruciais da micropropagação é a formação das raízes adventícias que irão constituir o sistema radicular da planta. A rizogénese adventícia de rebentos multiplicados *in vitro* depende da presença de células que respondam a estímulos indutores tornando-se determinadas para a produção de raízes. A quase totalidade das culturas *in vitro* exige um tratamento com auxina como estímulo indutor.

Na formação *de novo* de meristemas radiculares adventícios, células aparentemente indistintas das células circundantes reactivam o seu ciclo celular, iniciam um processo de divisão e originam primórdios radiculares. O esclarecimento do sistema de controlo do ciclo celular permite identificar os mecanismos que presidem ao início, à progressão e ao termo do ciclo celular, assim como os que podem conduzir aos processos de diferenciação. O sistema de controlo do ciclo celular baseia-se principalmente em dois tipos de proteínas: ciclinas e cinases proteicas dependentes de ciclinas (CDKs).

Neste trabalho são revistos os resultados disponíveis sobre a regulação do ciclo celular nomeadamente em células cuja divisão está associada à rizogénese adventícia.

Palavras-chave: Ciclinas; Ciclo celular; Cinases proteicas dependentes das ciclinas (CDKs); Enraizamento adventício; Rizogénese.

ABSTRACT

In vitro culture of woody species enables cloning adult specimen difficult or even impossible to propagate through conventional vegetative methods. However, large-scale application of micropropagation techniques can result in a dramatic low yield of new plants. This is mainly due to the difficulty in rooting clones micropropagated from adult plants.

⁽¹⁾ Doutora em Engenharia Agronómica, R. Luis Albuquerque, 20, 2780-877 Porto Salvo.

⁽²⁾ Professora Associada, DBEB/CBAA, Inst. Sup. Agronomia, Univ. Técnica de Lisboa, 1349-018 Lisboa, E-mail: sampor@isa.utl.pt.

One crucial phase of micropropagation is adventitious rooting giving rise to the plant root system. Adventitious rhizogenesis of *in vitro* microcuttings depends on the presence of cells that respond to inducing stimulus and become determined for root production. Almost all *in vitro* cultures need auxin treatment as inducing stimulus.

When the adventitious root meristem is formed *de novo*, cells that are apparently identical to the surrounding ones activate the cell cycle and initiate a process of cellular divisions, giving rise to root primordia. The molecular regulation of plant cell cycle includes the cellular mechanisms controlling cell cycle, initiation and progression, and cellular differentiation. The cell cycle control system depends on two main protein families: cyclins and cyclin dependent protein kinases (CDKs).

In the present paper the available data on the regulation of plant cell cycle are revised, particularly in cells associated to adventitious rhizogenesis.

Keywords: Adventitious rooting; Cell cycle; Cyclins; Cyclin dependent protein kinase (CDK); Rhizogenesis.

1. Introdução

A micropropagação de espécies lenhosas é uma área de investigação de elevado interesse, particularmente quando associada ao melhoramento florestal, na perspectiva da clonagem de árvores adultas, cuja propagação vegetativa é difícil ou mesmo impossível através de técnicas tradicionais. Com essas técnicas obtêm-se baixas taxas de regeneração sobretudo devido à perda de capacidade de enraizamento que acompanha a transição da planta jovem para a fase adulta.

Em cultura *in vitro*, plantas lenhosas adultas podem apresentar um efeito de rejuvenescimento e conseqüente recuperação da capacidade de enraizamento. O estudo do rejuvenescimento, como outros aspectos da biologia do desenvolvimento, seguiu métodos empíricos baseados na aplicação de tratamentos exógenos, normalmente com auxinas, a que se seguiam meses ou anos de observação dos efeitos na morfologia e fisiologia do sistema biológico. Nos últimos 20 anos, a utilização de marcadores bioquímicos e moleculares permitiu avaliar num espaço de tempo mais curto o grau de rejuvenescimento obtido (Francllet, 1991). De facto, a identificação de marcadores do enraizamento de determinada espécie, que permitam de modo simples e rápido aferir o seu potencial de enraizamento e estabelecer o momento adequado para a aplicação de tratamentos indutores, pode dar origem a elevados ganhos na aplicação comercial das técnicas de propagação vegetativa de plantas (Hand, 1994).

De um modo geral, as raízes formadas em zonas da planta que não o embrião ou a raiz primária são denominadas *raízes adventícias* (Barlow e

Palma, 1997). A formação de raízes adventícias requer que uma ou mais células do órgão rizogénico adoptem um novo programa de desenvolvimento (Mohnen, 1994). De uma maneira geral, as raízes, primárias, laterais ou adventícias, desempenham as mesmas funções e, frequentemente, possuem uma organização anatómica e histológica idêntica. Contudo exibem diferenças acentuadas na sua ontogenia e formação do meristema pois, ao contrário da raiz primária, as raízes laterais e as raízes adventícias desenvolvem-se a partir de células diferenciadas que desdiferenciam antes de dar origem ao novo meristema (Aeschbacher *et al.*, 1994). Os padrões de crescimento e organização das raízes podem considerar-se relativamente mais simples do que os de outros órgãos, o que permite aprofundar a compreensão dos mecanismos genéticos e moleculares do enraizamento.

Seguindo uma abordagem histológica, os estádios precoces da rizogénese adventícia envolvem a formação de uma estrutura arredondada com 4 camadas de células, derivadas de divisões celulares periclinais. Numa fase seguinte observa-se o padrão radial típico de uma raiz que deriva de divisões de células em camadas distintas. O alongamento da raiz resulta, tal como na raiz primária, da divisão e expansão de células apicais (Malamy e Benfey, 1997). A nível molecular muitos dos padrões de expressão génica estudados permitem estabelecer um paralelismo entre os diferentes tipos de raiz. De facto, a maioria dos mutantes para o desenvolvimento radicular apresenta alterações semelhantes nas raízes primárias e nas raízes laterais, sugerindo a existência de um único programa molecular para o estabelecimento de uma raiz (Malamy e Benfey, 1997). O primeiro passo da iniciação de raízes laterais ou adventícias é a ocorrência de divisões celulares na sequência de um estímulo que induz um sinal celular. De algum modo, um determinado grupo de células, aparentemente indistintas das células circundantes, reactiva o seu ciclo celular e inicia um processo de divisão. Sendo o ciclo celular um processo altamente controlado é importante compreender os seus passos de regulação assim como o início dos processos de diferenciação. O sistema de controlo do ciclo celular baseia-se, principalmente, em duas famílias proteicas: as cinases de proteínas (P-cinases / CDK) e as ciclinas.

Resultados recentes têm posto em evidência o papel da divisão celular no crescimento e arquitectura da planta. Contudo, não é universalmente aceite que a divisão celular seja a força motriz do crescimento. Resultados obtidos com tabaco transgénico exprimindo um mutante negativo para CDKs, que provocou a diminuição das taxas de produção de todos os tipos celulares, apresentou os órgãos com a mesma dimensão dos do selvagem. As células,

embora em menor número, adquiriram maiores dimensões (Hemerly *et al.*, 1995). Os estudos em curso deverão vir a fornecer mais dados relativamente à modulação da divisão celular nas plantas, nomeadamente no que respeita à rizogénese adventícia. No presente trabalho são revistos os resultados disponíveis até ao momento.

2. Rizogénese adventícia: competência e determinação

Com base em características histológicas, Moncousin (1991) dividiu o processo de rizogénese adventícia em seis fases distintas e sequenciais:

- 1 – inexistência de alterações citológicas visíveis;
- 2 – dilatação do núcleo das células que irão formar o primórdio;
- 3 – ocorrência de divisões do câmbio;
- 4 – presença de um grupo de células com características morfogénicas;
- 5 – aparecimento do meristema ainda incluso nos tecidos (meristemóide);
- 6 – emergência da primeira raiz.

A primeira fase corresponde à indução das células, envolvendo uma série de alterações bioquímicas e moleculares essenciais para desencadear as divisões celulares (Gaspar *et al.*, 1997). As células que sofrem indução situam-se normalmente em tecidos vasculares ou cambiais sendo denominadas *iniciais*. Nesta fase pode verificar-se ainda uma grande plasticidade relativamente ao destino das células. Subsequentemente ocorrem divisões de forma organizada, originando-se um primórdio. Progressivamente dá-se a diferenciação dos tecidos vasculares permitindo a ligação ao sistema vascular do caule e a funcionalidade da nova raiz.

A rizogénese adventícia de rebentos multiplicados *in vitro* tem por base a presença de células ditas *competentes* ou seja, susceptíveis de exibir resposta a estímulos indutores. Uma vez expostas ao estímulo indutor, essas células podem tornar-se *determinadas* para a produção de raízes, mesmo na ausência de estímulo subsequente (Mohnen, 1994). Regra geral, o estímulo indutor da rizogénese é fornecido pela auxina em combinação ou não com baixos níveis de citocininas.

O facto da capacidade de enraizamento variar conforme as espécies e a fase ontogénica sugere que células submetidas ao estímulo auxínico podem

não chegar a atingir o estado de competência. James (1983) comparou a resposta de diferentes espécies e órgãos em cultura a tratamentos de indução do enraizamento e concluiu que o tempo de exposição à auxina requerido para um enraizamento óptimo depende não só do tipo e concentração da hormona, mas também da espécie e da idade ontogénica da planta em estudo. Por exemplo, segmentos de pecíolo de *Hedera helix* em fase juvenil e adulta diferem acentuadamente no seu potencial de enraizamento, sendo o material adulto difícil de enraizar (Geneve *et al.*, 1988). Estas diferenças são devidas a características das células iniciais, não estando relacionadas com a translocação de quaisquer inibidores ou promotores (Mohnen, 1994). Em material de hera, juvenil ou adulto, em cultura *in vitro* sem auxina não se observam quaisquer divisões celulares mas na presença de auxina é induzida a formação de raízes em material juvenil e de *callus* no material adulto. Tais resultados parecem indicar que apesar da proliferação celular resultante do estímulo auxínico, somente os pecíolos juvenis são competentes para iniciar o enraizamento (Murray *et al.*, 1998).

Em resumo, pode generalizar-se que o material juvenil da maior parte das espécies enraíza facilmente. O tratamento com auxinas aumenta, regra geral, as taxas de enraizamento enquanto em material adulto da mesma espécie as auxinas podem ter um efeito nulo ou bastante mais reduzido (Zimmerman *et al.*, 1985).

3. Regulação do enraizamento adventício

3.1. Regulação génica

O enraizamento adventício revelou-se um processo bastante adequado ao estudo da morfogénese. As raízes são órgãos simples, com padrões de crescimento uniformes e contínuos e que possuem um número limitado de tipos celulares dispostos segundo uma simetria radial. Estas características facilitam a identificação e caracterização de mutantes relativamente ao tipo selvagem (Aechbacher *et al.*, 1994). A maior parte dos estudos sobre o controlo genético e molecular da rizogénese foi realizada em *Arabidopsis thaliana*, tendo-se verificado que o gene de ciclina *cyc1At* (Ferreira *et al.*, 1994), ou os genes de proteínas-cinases, *cdc2* e *cdc2a* (Martinez *et al.*, 1992), se expressam em tecidos radiculares. No entanto, a identificação dos genes que afectam

exclusivamente a formação de raízes laterais ou adventícias tem apresentado algumas dificuldades por esses genes poderem desempenhar funções idênticas nas raízes primárias ou noutros processos de desenvolvimento, ou por pertencerem a famílias de genes com funções idênticas (Smith e Fedoroff, 1995). Apesar dos resultados disponíveis sugerirem a existência de um programa comum durante a formação de raízes laterais e adventícias, não é de excluir que surjam algumas diferenças na regulação da sua formação. De facto foram identificados os mutantes *alf4* em *Arabidopsis* e *rtcs* em milho que apresentam deficiências somente nas raízes laterais, e o mutante *mp* que apresenta uma raiz primária deficiente mas é capaz de emitir raízes adventícias normais (Malamy e Benfey, 1997).

A formação de raízes laterais e de raízes adventícias apresenta características anatómicas comuns pois em ambos os tipos o primórdio emerge até ao exterior através do córtex e da epiderme. Em tabaco, foi identificada uma glicoproteína rica em hidroxiprolina, HRGPnt3, que se expressa de modo transitório durante a formação de raízes laterais e adventícias (Vera *et al.*, 1994). A HRGPnt3 é uma proteína da parede celular que poderá desempenhar uma função estrutural especializada na iniciação da divisão celular bem como durante o crescimento do primórdio até à emergência da raiz. Durante a formação de raízes adventícias, a expressão do gene *HRGPnt3* ocorre num grupo muito restrito de células de tecido vascular do caule e nas células do primórdio durante o seu crescimento através do córtex e epiderme, cessando após a emergência da raiz (Vera *et al.*, 1994). Em mutantes *rac* de tabaco incapazes de formar raízes adventícias, verifica-se que o promotor do gene *HRPGnt3* se encontra bloqueado (Lund *et al.*, 1997).

3.2. Regulação hormonal

Os reguladores do crescimento desempenham um papel fundamental no controlo da morfogénese. O desenvolvimento de técnicas que permitem a separação e quantificação das fitohormonas livres ou conjugadas permitiu acompanhar o seu padrão de variação em diversos processos do desenvolvimento. A implicação das auxinas na iniciação de raízes laterais e adventícias foi demonstrada em diversos estudos fisiológicos e genéticos. As auxinas naturais parecem derivar da parte aérea da planta, o que é sugerido pelo facto da excisão de tecidos aéreos (Wightman e Thimann, 1980) ou a aplicação de inibidores do transporte auxínico (Reed *et al.*, 1998), inibirem a formação de raízes laterais.

Apesar das evidências disponíveis quanto ao papel central das auxinas na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal, a aplicação de técnicas bioquímicas não permitiu elucidar completamente a ligação causal entre as auxinas e o crescimento e desenvolvimento vegetal *in vivo*. Mais recentemente, através da análise de mutantes e da utilização de técnicas de engenharia genética foi possível aprofundar o estudo do papel das hormonas em processos causais da morfogénese.

Embora o modelo geral de acção das auxinas sobre o enraizamento esteja ainda relativamente fragmentado, a maior parte dos estudos moleculares sobre o papel das auxinas no enraizamento tem sido realizada em *Arabidopsis thaliana*. De acordo com as revisões de Hobbie (1998) e de Leyser (1997) já foram identificados vários genes importantes na resposta à auxina, nomeadamente:

- SUR1:** relacionado com a inibição da síntese de auxina, em que o mutante produz auxina em concentração superior ao tipo selvagem (Boerjan *et al.*, 1995);
- AUX1:** relacionado com a absorção de auxina através da membrana (Bennet *et al.*, 1996);
- AXR1:** relacionado com a transdução de sinais e percepção da auxina, codifica uma proteína homóloga à enzima E1 responsável pela activação de ubiquitina (Timpte *et al.*, 1995);
- AXR2:** relacionado com o alongamento celular, sendo os mutantes deste gene hipersensíveis à auxina, especialmente na produção de raízes adventícias (Boerjan *et al.*, 1995).

A via de transdução do sinal auxínico é igualmente um tema em investigação, não existindo ainda um modelo global. Importa identificar os receptores das auxinas, as cascatas de reacções, os mensageiros secundários e a função *in vivo* dos genes induzidos pelas auxinas (Hobbie, 1998). Foram identificadas algumas proteínas capazes de se ligarem a auxinas, sendo a mais estudada a ABP1 (Auxin Binding Protein 1), não estando totalmente confirmado o seu papel como receptor fisiológico das auxinas. Foi igualmente identificado um grupo de genes cuja expressão parece ser regulada pelas auxinas, entre os quais se encontram genes de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular e genes de enzimas envolvidas na biossíntese da parede celular (Sitbon e Perrot-Rechenmann, 1997).

3.3. Resultados obtidos com plantas transgênicas

A aplicação de técnicas de engenharia genética permitiu igualmente aprofundar o estudo dos mecanismos causais da rizogênese, nomeadamente em plantas transformadas por intermédio de *Agrobacterium*. Nos estudos sobre rizogênese a maior parte dos genes introduzidos no genoma de uma planta por transformação com estirpes selvagens de *Agrobacterium* provocam alterações na concentração endógena de auxina.

A bactéria *Agrobacterium rhizogenes* é responsável pelo síndrome “hairy root” que se caracteriza pela formação abundante de raízes adventícias no local de infecção. A patogenicidade da bactéria está relacionada com a presença de um plasmídeo indutor da formação de raízes (Ri). Durante o processo de infecção, a sequência T-DNA (DNA de transferência) do plasmídeo é transferida para as células infectadas da planta e a expressão dos seus genes passa a ser efectuada pela planta. A activação dos promotores dos genes do T-DNA permite induzir a divisão celular e a formação de raízes adventícias na zona infectada tendo sido identificados alguns *loci* particularmente importantes neste processo, os *rol* (de “root locus”) A, B, C e D (Nilsson *et al.*, 1997).

O gene *rolB* pode, isoladamente, induzir o crescimento das raízes adventícias nos sistemas testados (Spena *et al.*, 1987). Este gene codifica uma proteína de 30 kDa, localizada na membrana plasmática, que possui actividade de tirosina-fosfatase (Filippini *et al.*, 1996). Plantas de tabaco transgênicas expressando o gene *rolB* apresentam alterações na morfologia das folhas e das flores e um forte aumento da formação de raízes adventícias (Schmülling *et al.*, 1988). Foram propostas duas hipóteses para explicar a acção da proteína RolB. A primeira defende que a RolB actua através do aumento do teor de AIA livre devido à hidrólise de conjugados inactivos. No entanto, em plantas de tabaco transgênicas os níveis de AIA não são particularmente elevados e os conjugados mais abundantes, AIA-amidas, não são substratos da RolB (Delbarre *et al.*, 1994; Estruch *et al.*, 1991). A segunda hipótese propõe que a proteína RolB confira maior sensibilidade às auxinas, mesmo em células normalmente pouco sensíveis à hormona. Esta hipótese é reforçada pelo facto da proteína RolB possuir actividade tirosina-fosfatase, podendo pois participar em vias de percepção e transdução de sinais (Filippini *et al.*, 1996). Segundo alguns autores, o gene *rolB* não impõe novos programas de diferenciação, mas antes amplifica o processo de formação de raízes (Cola *et al.*, 1996). O gene não parece promover especificamente a formação de raízes, mas antes activar a formação de meristemas no âmbito geral da morfogênese.

4. Regulação do ciclo celular na rizogénese adventícia

4.1. O controlo do ciclo celular das plantas

Como foi referido, a emissão de raízes adventícias requer que um determinado grupo de células, aparentemente indistintas das células circundantes, re-active o seu ciclo celular e inicie um processo de divisão que conduz à formação do meristema, originando o primórdio radicular.

O ciclo celular é um processo altamente controlado que permite a duplicação e segregação fidedignas do material genético, englobando dois acontecimentos principais: a fase de replicação dos cromossomas, fase S, e a fase de segregação dos cromossomas replicados, fase M ou *mitose*. Nas células somáticas as fases S e M estão separadas por fases intercalares: G1, que precede a replicação do DNA e G2 que precede a mitose. Na transição entre fases, actuam mecanismos de controlo altamente conservados nas diversas espécies, denominados pontos de controlo (“check-points”) (BursSENS *et al.*, 1998; Doerner, 1994; Francis e Halford, 1995). Estes mecanismos têm origem na própria célula e derivam da necessidade de coordenação dos eventos do ciclo celular no espaço e no tempo. No caso das células vegetais alguns destes mecanismos estão dependentes de sinais externos e internos, nomeadamente da acção de reguladores de crescimento, permitindo a integração do processo de divisão celular com o crescimento e desenvolvimento do organismo.

A progressão do ciclo celular depende principalmente da expressão de duas famílias de proteínas embora, em maior ou menor grau, outras proteínas possam igualmente estar envolvidas. A primeira família é constituída por *proteínas-cinases-dependentes-das-ciclinas* (“cyclin dependent protein kinases” ou CDKs), que fosforilam selectivamente resíduos de serina ou treonina de proteínas com funções estruturais ou de regulação. A segunda é uma família de proteínas denominadas *ciclinas* por a sua expressão variar ao longo do ciclo. Ligando-se às CDKs regulam a capacidade fosforilativa destas últimas e formam o chamado factor de promoção da mitose ou MPF, cuja actividade varia ao longo do ciclo celular (Hunter, 1993; King *et al.*, 1994). A progressão do ciclo celular pode depender ainda de outros factores que regulam a expressão ou a actividade das CDKs através da sua proteólise ou interacção com outras proteínas reguladoras, como será referido mais adiante.

4.1.1. CDKs – Proteínas-cinases dependentes das ciclinas

A divisão celular é um fenómeno universal nos seres vivos e, deste modo, muitos dos elementos que controlam a progressão do ciclo celular são comuns aos procariontes e eucariontes (Amon, 1998). O grau de conservação evolutiva é especialmente acentuado nos eucariontes, onde a progressão pelas várias fases do ciclo celular é conduzida pela mesma classe de proteínas desde as leveduras até ao homem. Trata-se de cinases heterodiméricas, constituídas por cinases dependentes das ciclinas (CDK), e por ciclinas responsáveis pela sua activação.

A primeira indicação sobre o funcionamento de um sistema homólogo no reino vegetal surgiu com a identificação em *Chlamydomonas* de uma proteína imunologicamente relacionada com as CDKs animais (John *et al.*, 1989). A esta descoberta seguiu-se a clonagem de um fragmento de DNA que codificava uma proteína do tipo CDK em ervilheira (Feiler e Jacobs, 1990). Entretanto foram identificadas CDKs em todas as espécies analisadas, nomeadamente: *Medicago sativa* (Hirt *et al.*, 1993), *Arabidopsis thaliana* (Ferreira *et al.*, 1991; Hirayama *et al.*, 1991), *Antirrhinum majus* (Fobert, *et al.*, 1996), *Oryza sativa* (Hata, 1991a), *Pisum sativum* (Feiler e Jacobs, 1990, 1991) *Beta vulgaris* (Fowler *et al.*, 1998) e *Zea mays* (Colasanti *et al.*, 1991).

O protótipo das CDKs de eucariontes é a proteína p34^{cdc2} de *Schizosaccharomyces pombe*, uma proteína-cinase com 34 KDa produto do gene *cdc2* (Jacobs, 1995). Quando na levedura são impostas condições restritivas a mutantes no alelo *cdc2*, estes sofrem um bloqueio entre G1 e S ou entre G2 e M, dependendo da fase do ciclo em que se encontram (Nurse e Bisset, 1981). Este facto demonstra a importância do produto de um único gene na regulação da transição G1-S e na entrada em mitose. Em *Saccharomyces cerevisiae*, quer a transição G1-S como G2-M dependem do produto do gene *cdc28*, homólogo de *cdc2*.

Ao contrário das leveduras, os eucariontes superiores evoluíram no sentido da utilização de várias CDKs na regulação de diferentes fases do ciclo celular (De Veylder *et al.*, 1998). As CDKs vegetais são proteínas com cerca de 300 aminoácidos, uma massa molecular de 33-35 kDa, apresentando entre 60 e 65% de homologia com as sequências de *cdc2* e *cdc28* de leveduras (Jacobs, 1995). Foram já identificadas e clonadas várias CDKs de plantas, podendo distinguir-se pelo menos 5 tipos, designados A, B, C, D e E (Mironov *et al.*, 1999). A classe mais bem caracterizada é a das CDKs do tipo-A, que engloba as cinases mais semelhantes às *cdc2/cdc28* de leveduras. No entanto, nem

todas as plantas possuem CDKs pertencentes às 5 classes (Fobert *et al.*, 1996; Sundaresan e Colasanti, 1998). Actualmente pode considerar-se que os tipos A e B estão bem definidos; quanto às restantes classes conhecem-se somente um ou dois membros cuja distribuição no reino vegetal é ainda pouco conhecida.

4.1.2. Ciclinas

A actividade das CDKs está dependente da sua ligação aos reguladores proteicos de efeito positivo designados ciclinas. As ciclinas foram inicialmente identificadas graças ao seu padrão cíclico de acumulação e destruição durante as divisões celulares sincronizadas que ocorrem no desenvolvimento embrionário do lamelibrânquio *Xenopus*. Na sequência de estudos realizados em leveduras e animais as ciclinas foram subdivididas em dois grandes grupos: ciclinas mitóticas e ciclinas G1. As ciclinas mitóticas, que se expressam durante a mitose, podem ser de tipo A ou de tipo B. As ciclinas mitóticas parecem ser excelentes marcadores moleculares do estado de proliferação celular, nomeadamente devido à sua função celular bem definida e rápido “turnover” (Hata *et al.*, 1991 b; Hemerly *et al.*, 1992; Hirt *et al.*, 1992; Soni *et al.*, 1995). No grupo G1 incluem-se as ciclinas de tipo D e E. As ciclinas do tipo D têm um papel fundamental no decurso da transição G1-S, sendo designadas ciclinas da fase G1 (De Veylder *et al.*, 1999).

Foram identificados genes que codificam ciclinas em diversas espécies vegetais e, curiosamente, em número muito superior às 10 ciclinas de tipo A e B identificadas em leveduras e animais. De momento faltam estudos funcionais que permitam esclarecer a função do elevado número de genes de ciclinas identificados em várias espécies de plantas como, por exemplo: *Arabidopsis thaliana* (Day e Reddy, 1998; De Veylder *et al.*, 1999; Hemerly *et al.*, 1992; Soni *et al.*, 1995), *Medicago sativa* (Meskiene *et al.*, 1995), *Nicotiana tabacum* (Qin *et al.*, 1995; Setiandy *et al.*, 1995; Tréhin *et al.*, 1997), *Glycine max* (Kouchi *et al.*, 1995), *Beta vulgaris* (Fowler *et al.*, 1998) e *Daucus carota* (Hata *et al.*, 1991 b). A análise da sequência de nucleótidos numa região altamente conservada e designada “cyclin box”, permitiu a classificação das ciclinas em sub-grupos: A1, A2, A3, B1, B2, D1, D2, D3 e D4, em função das semelhanças com as ciclinas de tipo A, B e D de mamíferos (De Veylder *et al.*, 1999; Mironov *et al.*, 1999; Renaudin *et al.*, 1996, 1998).

4.2. Mecanismos de regulação do ciclo celular nas plantas

Nas plantas reconhece-se que somente uma parte das CDKs e ciclinas identificadas até à data está envolvida no controlo do ciclo celular. Contudo, existem algumas evidências que permitem associar estas proteínas ao ciclo celular: certos complexos CDK-ciclinas de plantas são capazes de substituir os seus homólogos de leveduras ou animais. Podem referir-se alguns exemplos: o gene de uma ciclina D de luzerna complementa o de uma levedura deficiente em ciclina G1 (Dahl *et al.*, 1995); ciclinas mitóticas de *Arabidopsis* (Day *et al.*, 1996) e de tabaco (Setiandy *et al.*, 1995) complementam mutantes de levedura.

De um modo geral, as experiências realizadas em *Arabidopsis* sugerem que o controlo da divisão celular seja devido apenas à acção das cinases CDC2aAt, CDC2bAt e da ciclina CYCB1;1, e aos homólogos correspondentes nas restantes espécies vegetais (Mironov *et al.*, 1999). Hemerly e colaboradores (1995) demonstraram que a actividade da CDC2aAt é suficiente para alterar a taxa de proliferação celular e outros aspectos da divisão celular, como o plano de divisão e a dimensão celular. Em raízes de *Arabidopsis* a proliferação celular sofreu um forte aumento devido à sobre-expressão do gene CYCB1;1 indicando que, pelo menos nesta espécie, a expressão de CYCB1;1 pode ser um factor regulador da divisão celular (Doerner *et al.*, 1996).

4.2.1. Expressão de CDKs e ciclinas

A análise da expressão das CDKs e das ciclinas vegetais tem-se centrado sobretudo na acumulação de produtos da transcrição o que permitiu confirmar que algumas CDKs e quase todas as ciclinas vegetais apresentam um padrão cíclico de variação (Mironov *et al.*, 1999). Os produtos da transcrição de CDKs do tipo-B acumulam-se preferencialmente nas fases S e G2 (Segers *et al.*, 1996) ou G2 e M, enquanto as CDKs do tipo-A apresentam uma expressão independente da fase do ciclo celular (Fobert *et al.*, 1996; Magyar *et al.*, 1997; Umeda *et al.*, 1999).

Tal como acontece nos animais, a regulação da expressão das ciclinas do tipo A e B das plantas parece ocorrer, pelo menos parcialmente, ao nível da transcrição (Mironov, 1999). É referida a relação que existe entre os tipos de ciclinas e o seu padrão de expressão ao longo do ciclo em células de *Arabidopsis* (Fuerst *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 1997), soja (Kouchi *et al.*, 1995); tabaco (Qin *et al.*, 1996; Setiandy *et al.*, 1995) e arroz (Sauter, 1997). Além disso, estudos de imunofluorescência realizados em ápices radiculares de milho indicam a

expressão preferencial das ciclinas mitóticas A1, B1 e B2 na fase G2 e M e sugerem que a expressão das ciclinas A1 e B1 persiste durante a telofase (Mews *et al.*, 1997).

A maior parte das ciclinas do tipo D apresenta níveis de expressão constantes ao longo do ciclo celular, tendo sido proposta a sua intervenção no controlo da progressão da fase G1 em resposta a factores nutricionais e outros (De Veylder *et al.*, 1999; Fuerst *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 1998; Soni *et al.*, 1995). No entanto, as ciclinas CYCD2;1 e CYCD3;1 de tabaco expressam-se predominantemente na transição G2-M (Sorrell *et al.*, 1999) o que sugere o seu envolvimento na mitose. A expressão da CYCD4;1 de *Arabidopsis* pode ser observada durante a embriogénese, o desenvolvimento do tecido vascular e a formação de primórdios de raízes laterais (De Veylder *et al.*, 1999).

4.2.2. Acção de outros reguladores do ciclo celular

Além das ciclinas, outras proteínas podem interagir com as CDKs. A família das CKS (de “CDK sub-unit”) é constituída por proteínas que parecem ser essenciais à progressão do ciclo celular nas leveduras e nos vertebrados, embora os mecanismos moleculares de actuação não estejam totalmente esclarecidos (Mironov *et al.*, 1999). Em ápices radiculares de *Vicia faba*, a utilização de inibidores da actividade das CDKs causou anomalias no fuso mitótico e consequentemente no arranjo dos cromossomas na placa metafásica (Binarová *et al.*, 1998). Em animais e leveduras, os inibidores mais estudados constituem um grupo de proteínas referidas como inibidores das CDKs (ICKs) que, ao ligarem-se às CDKs ou aos complexos CDK/ciclina, inibem a sua actividade. Wang *et al.* (1998) isolaram pela primeira vez em plantas o gene de um destes inibidores (*ICK1*).

4.2.3. Fosforilação e degradação das CDKs

A análise da regulação pós-tradução do complexo ciclina-CDK mostrou que a sua actividade é regulada por reacções de fosforilação (Gu *et al.*, 1992) que podem bloquear a actividade cinásica (Nurse, 1990). Em todos os eucariotas estudados até à data, durante a interfase a CDC2 permanece inactiva por fosforilação do resíduo Tyr-15 (Y15) e em menor extensão do resíduo adjacente Thr-14 (T14). Durante a mitose estes resíduos são desfosforilados (Gautier *et al.*, 1991; Gould e Nurse, 1989; Krek e Nigg, 1991). Em *S. pombe* a substituição do resíduo Y15 por um resíduo fenilalanina levou à activação da CDC2 e

consequente entrada prematura em mitose, o que sugere uma regulação negativa da CDC2 por fosforilação em Y15 (Gould e Nurse, 1989). A fosfatase que remove o fosfato do resíduo Y15 e possivelmente do T14, é denominada CDC25 e, curiosamente, a sua actividade parece ser mediada por interacção com ciclinas do tipo-B. Outros resultados mostram que mutação nos resíduos Y15 ou T14 ou T161 antecipam a entrada em mitose (Krek e Nigg, 1991).

Os estudos realizados em plantas, sugerem a existência de um tipo de regulação análogo ao citado. Por exemplo, em células de *Nicotiana plumbaginifolia* em suspensão a entrada em mitose requer a presença de citocininas (John *et al.*, 1993); no entanto, introduzindo nas células de tabaco o gene *cdc25* de levedura pode-se diminuir a concentração da hormona (John, 1998).

A proteólise é outro mecanismo de regulação das transições do ciclo celular. Dos resultados disponíveis pode-se referir que algumas CDKs do tipo B devem estar sujeitas a degradação e remoção nas fases S e início de G2, uma vez que há um desfasamento entre a acumulação de transcritos e de proteína (Mironov *et al.*, 1999). Restam poucas dúvidas sobre esta forma de controlo nas plantas pois verificam-se alguns dos pressupostos associados à regulação por proteólise. De facto, o sistema de proteólise dependente da ubiquitina está presente nas células vegetais e a expressão de alguns dos seus elementos relaciona-se com a divisão celular (Plesse *et al.*, 1998); as ciclinas vegetais dos tipos A e B possuem a chamada “sequência de destruição”, uma marcação para a degradação pela via da ubiquitina, que parece explicar a instabilidade de proteínas do ciclo celular em células de tabaco (Genschik *et al.*, 1998); finalmente, a presença em CDKs e ciclinas de sequências ricas em resíduos de prolina, glutamato, serina e treonina que intervêm na proteólise (Mironov *et al.*, 1999). Estas indicações não são, no entanto, definitivas pois algumas ciclinas de milho que possuem a “sequência de destruição” são resistentes à proteólise no decurso da anafase, sugerindo a existência de mecanismos de protecção selectiva das ciclinas (Mews *et al.*, 1997).

4.3. Modelo de regulação do ciclo celular nas plantas

Nos organismos pluricelulares, com tipos e funções celulares especializadas, o crescimento não é suficiente para determinar os complexos modelos e taxas de divisão celular. O controlo da proliferação celular é apenas um dos aspectos do desenvolvimento; o controlo do ciclo está necessariamente integrado em processos de regulação da expansão e da diferenciação. Com o avanço dos

conhecimentos sobre os mecanismos básicos de controlo do ciclo celular em plantas foram identificados numerosos factores chave e propostos alguns modelos de funcionamento. Recentemente, Mironov *et al.* (1999) desenvolveram um modelo para o controlo do ciclo celular em plantas que, em síntese, propõe a seguinte sequência de acontecimentos: Em células na fase G1 e em resposta ao estímulo mitótico (certamente de tipo auxínico) são produzidas ciclinas do tipo D que se associam a CDKs tipo A tornando-as activas. O complexo resultante activa proteínas por fosforilação que desencadeiam a fase S. Durante a fase S são sintetizadas ciclinas do tipo A que activam CDKs-A. Quando as células atingem o final da fase S, a actividade das CDKs é inibida pela fosforilação como referido em 4.2.3. Na fase G2 formam-se ciclinas do tipo B que podem activar cinases CDK-A ou CDK-B dando origem à transição G2-M. O funcionamento e activação das CDKs mitóticas requer a sua associação com factores de tipo CKS (cyclin kinase sub-unit) e desfosforilação, um processo regulado pelas citocininas. Em qualquer fase do ciclo este pode ser travado pela ligação das CDK-A com inibidores do tipo CKI.

Quando se identificarem completamente os substratos dos complexos CDK/ciclinas e o seu papel específico na regulação das diversas fases do ciclo celular das plantas, deverá ser mais fácil compreender o modo como se inicia a divisão celular e os processos de diferenciação, permitindo esclarecer o papel da divisão celular, nomeadamente da divisão assimétrica, no crescimento e arquitectura da planta.

5. Considerações finais

O acontecimento chave da rizogénese adventícia é a formação *de novo* de um meristema a partir de células de um órgão distinto do embrião ou da raiz primária. O processo envolve a desdiferenciação de células pré-induzidas, seguido de divisão, diferenciação e crescimento celular, originando o meristema. O desenvolvimento posterior do primórdio conduz à emergência e crescimento da raiz. As células dizem-se competentes para o enraizamento quando são capazes de responder a um estímulo indutor (geralmente auxinas e/ou efeito de ferida) através da formação de primórdios de raiz. Parece claro que tais alterações no destino celular envolvem alterações muito complexas a nível bioquímico e de expressão génica. É reconhecido o papel crucial das auxinas na formação de raízes adventícias embora estas não constituam o único sinal

envolvido no processo. Portanto, para além dos teores de auxina, têm sido sugeridos outros marcadores bioquímicos do enraizamento, embora os resultados disponíveis sejam, por vezes, contraditórios. O problema parece estar relacionado com a dificuldade em registar e medir correctamente acontecimentos localizados num número reduzido de células, além de ser difícil isolar os factores-chave quando estes participam em interacções bioquímicas extremamente complexas

No início do século XX os estudos sobre o controlo do enraizamento adventício basearam-se num conceito bastante simplista: “o enraizamento é controlado por substâncias químicas que se acumulam na base do caule”. Contudo, este conceito teve a vantagem de conduzir ao estudo de uma série de compostos químicos e consequente disponibilização de dados práticos relativamente à propagação vegetativa de muitas espécies. Como os propágulos de um grande número de espécies não enraizam em resposta aos tratamentos clássicos, as teorias relacionadas com o controlo do enraizamento por acção de substâncias químicas, ou do balanço entre elas, não esclareceram totalmente os mecanismos fundamentais de controlo do enraizamento. Determinadas substâncias químicas podem e devem vir a revelar-se fundamentais no controlo do enraizamento embora inseridas num quadro mais alargado, do qual ainda se desconhecem muitas fracções. Mais recentemente, a biologia molecular veio fornecer contribuições decisivas para o esclarecimento da morfogénese em geral e da rizogénese em particular.

Como referido, o controlo do ciclo celular baseia-se na regulação da actividade do complexo ciclinas-CDKs. Em várias espécies vegetais, os mRNAs de CDKs acumulam-se nos meristemas radiculares e nos locais de activação de novos meristemas que dão origem a raízes laterais. Foi sugerido que a expressão dos genes de CDKs pode influenciar a competência para a proliferação celular, sendo no entanto requeridos alguns sinais adicionais para que a divisão celular prossiga. Ao contrário do registado para os genes de CDKs, a expressão das ciclinas ocorre somente em células meristemáticas, o que indica a sua estreita relação com a divisão activa e não com o potencial para divisão celular. Em *Arabidopsis*, o tratamento com AIA induziu a expressão de vários genes de ciclinas, particularmente de uma ciclina mitótica do tipo B. A expressão desta ciclina está estreitamente relacionada com a divisão celular no decurso da iniciação da raiz lateral em *Arabidopsis* e no crescimento do seu meristema apical. Aparentemente, a expressão deste tipo de ciclinas é um factor limitante na hierarquia de controlo da actividade do meristema e crescimento organizado do sistema radicular.

Em síntese, pode-se afirmar que o processo de enraizamento adventício resulta de acontecimentos ao nível da transcrição relacionados com a regulação do ciclo celular de certas células que se tornam competentes e vão dar origem às células iniciais do primórdio. A identificação dos genes cuja transcrição fornece as condições necessárias para o enraizamento, acompanhada do estudo da regulação pré e pós-transcricional desses genes, permitirá esclarecer melhor o processo de enraizamento adventício.

AGRADECIMENTOS

A presente revisão corresponde à adaptação da Introdução do Capítulo 8 “Expressão de ciclinas e activação do ciclo celular” da tese de doutoramento de uma das autoras (C.N.).

C.N. recebeu a bolsa PRAXIS XXI/BD/5104/95. A investigação foi realizada no CBAA que recebe financiamento Plurianual/FCT.

BIBLIOGRAFIA

- AESCHBACHER, R.A.; SCHIEFELBEIN, J.W.; BENFEY, P.N. (1994) — The genetic and molecular basis of root development, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45: 25–45.
- AMON, A. (1998) — Controlling cell cycle and cell fate: common strategies in prokaryotes and eukaryotes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 85–86.
- BARLOW, P.W.; PALMA, B. (1997) — *The place of roots in plant development*, in “Biology of Root Formation and Development” (A. Altman; Y. Waisel, Eds.), Plenum Press; Nova Yorque, pp. 1–10.
- BENNETT, J.M.; MARCHANT, A.; GREEN, H.G.; MAY, S.T.; WARD, S.P.; MILLNER, P.A.; WALKER, A.R.; SCHULTZ, B.; FELDMAN, K.A. (1996) — *Arabidopsis* AUX1 gene, a permease-like regulator of root gravitropism, *Science*, 273: 948–950.
- BINAROVÁ, P.; DOLEZEL, J.; DRABER, P.; HEBERLE-BORS, E.; STRNAD, M.; BÖGRE, L. (1998) — Treatment of *Vicia faba* root tips with specific inhibitors to cyclin-dependent kinases lead to abnormal spindle formation, *Plant J.*, 16: 697–707.
- BOERJAN, W.; CERVERA, M.-T.; DELARUE, M.; BEEKMAN, T.; DEWITTE, W.; BELLINI, C.; CABOCHE, M.; ONCKELES, H.V.; MONTAGU, M.V.; DIRK, I. (1995) — Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis* confers auxin overproduction, *Plant Cell*, 7: 1405–1419.
- BURSENS, S.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. (1998) — The cell cycle in *Arabidopsis*, *Plant Physiol. Biochem.*, 36: 9–19.

- COLA, A.D.; COSTANTINO, P.; SPANÒ, L. (1996) — Cell commitment and *rolB* gene expression in the induction of root differentiation, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 46: 203–209.
- COLASANTI, J.; TYERS, M.; SUNDARESAN, V. (1991) — Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34^{cdc2} homologue from *Zea mays*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3377–3381.
- DAHL, M.; MESKIENE, I.; BÖGRE, L.; CAM HÁ, D.T.; SWOBODA, I.; HUBMANN, R.; HIRT, H.; HEBERL-BORS, E. (1995) — The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G1 cyclin deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle, *Plant Cell*, 7: 1847–1857.
- DAY, I.S.; REDDY, A.S.N. (1998) — Isolation and characterization of two cyclin-like cDNAs from *Arabidopsis*, *Plant Mol. Biol.*, 36: 451–461.
- DAY, I.S.; REDDY, A.S.N.; GOLOVKIN, M. (1996) — Isolation of a new mitotic-like cyclin from *Arabidopsis*: complementation of a yeast cyclin mutant with a plant cyclin, *Plant Mol. Biol.*, 30: 565–575.
- DE VEYLDER, L.; ENGLER, J.A.; BURSSSENS, S.; MANEVSKI, A.; LESCURE, B.; VAN MONTAGU, M.; ENGLER, G.; INZÉ, D. (1999) — A new-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation, *Planta*, 208: 453–462.
- DE VEYLDER, L.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. (1998) — *Cell cycle control in Arabidopsis*, in “Plant Cell Division” (D. Francis; D. Dudits; D. Inzé, Eds.), Portland Press, Londres, pp. 1–19.
- DELBARRE, A.; MULLER, P.; IMHOFF, V.; BARBIER-BRYGOO, H.; MAUREL, C.; LEBLANC, N.; PERROT-RECHENMANN, C.; GUERN, J. (1994) — The *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* does not increase auxin sensitivity in tobacco protoplasts by modifying the intracellular auxin concentration, *Plant Physiol.*, 105: 563–569.
- DOERNER, P. (1994) — Cell cycle regulation in plants, *Plant Physiol.*, 106: 823–827.
- DOERNER, P.; JORGENSEN, J.-E.; YOU, R.; STEPPUHN, J.; LAMB, C. (1996) — Control of root growth and development by cyclin expression, *Nature*, 380: 520–523.
- ESTRUCH, J.J.; SCHELL, J.; SPENA, A. (1991) — The protein encoded by the *rolB* plant oncogene hydrolyses indole glucosides, *EMBO J.*, 10: 3125–3128.
- FEILER, H.S.; JACOBS, T.W. (1990) — Cell division in higher plants: a *cdc2* gene, its 34 kDa product, and histone H1 kinase activity in pea, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 5397–5401.
- FEILER, H.S.; JACOBS, T.W. (1991) — Cloning of the pea *cdc2* homologue by efficient immunological screening of PCR products, *Plant Mol. Biol.*, 17: 321–333.
- FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; VAN MONTAGU, M.; ENGLER, G.; INZÉ, D. (1994) — Developmental expression of the *Arabidopsis* cyclin gene *cyc1At*, *Plant Cell*, 6: 1763–1774.
- FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. (1991) — The *Arabidopsis* functional homolog of the p34^{cdc2} protein kinase, *Plant Cell*, 3: 531–540.
- FILIPPINI, F.; LO SCHIAVO, F.; TERZI, M.; COSTANTINO, P.; TROVATO, M. (1996) — The plant oncogene *rolB* alters binding of auxin to plant cell membranes, *Plant Cell Physiol.*, 35: 767–771.

- FOBERT, P.R.; GAUDIN, V.; LUNNESS, P.; COEN, E.S.; DOONAN, J.H. (1996) — Distinct classes of *cdc2*-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants, *Plant Cell*, 8: 1465–1476.
- FOWLER, M.R.; KIRBY, M.J.; SCOOT, N.W.; SLATER A.; ELLIOTT, M.C. (1998) — Induction of cell division-related genes in quiescent (G_0) sugar beet cells, *Physiol. Plant.*, 102: 61–70.
- FRANCIS, D.; HALFORD, N.G. (1995) — The plant cell cycle, *Physiol. Plant.*, 93: 365–374.
- FRANCLET A. (1991) — Biotechnology in “rejuvenation”: hope for the micropropagation of difficult woody plants, *Acta Hort.*, 289: 273–282.
- FUERST, R.; SONI, R.; MURRAY, J.; LINDSEY, K. (1996) — Modulation of cyclin transcripts in cultured cells of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.*, 112: 1023–1033.
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; HAUSMAN, J.F. (1997) — *Indissociable chief actors in the inductive phase of adventitious rooting*, in “Biology of Root Formation and Development” (A. Altman; Y. Waisel, Eds.), Plenum Press, Nova Iorque, pp. 55–64.
- GAUTIER, J.; SOLOMON, M.J.; BOOHER, R.N.; BAZAN, J.F.; KIRSCHNER, M.W. (1991) — Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34^{cdc2}, *Cell*, 67: 197–211.
- GENEVE, R.L.; HACKETT, W.P.; SWANSON, B.T. (1988) — Adventitious root initiation in de-bladed petioles from juvenile and mature phases of english ivy, *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, 113: 630–635.
- GENSCHIK, P.; CRIQUI, M.C.; PARMENTIER, Y. DEREVIER, A.; FLECK, J. (1998) — Cell cycle-dependent proteolysis in plants: identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the protease inhibitor MG132, *Plant Cell*, 10: 2063–2075.
- GOULD, K.L.; NURSE, P. (1989) — Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2*⁺ protein kinase regulates entry into mitosis, *Nature*, 342: 39–45.
- GREENWOOD, M.S.; DIAZ-SALA, C.; SINGER, P.B.; DECKER, A.; HUTCHINSON, K.W. (1997) — *Differential gene expression during maturation-caused decline in adventitious rooting ability in loblolly pine (Pinus taeda L.)*, in “Biology of Root Formation and Development” (A. Altman; Y. Waisel, Eds.), Plenum Press, Nova Iorque, pp. 203–208.
- GU, Y.; ROSENBLATT, J.; MORGAN, D.O. (1992) — Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15, *EMBO J.*, 11: 3995–4005.
- HAND P. (1994) — *Biochemical and molecular markers of cellular competence for adventitious rooting*, in “Biology of Adventitious Root Formation” (T.D. Davis; B.E. Haissig, Eds.) Plenum Press, Nova Iorque, pp. 111–121.
- HATA, S. (1991) — cDNA cloning of a novel *cdc2*⁺/CDC28-related protein kinase from rice, *FEBS L.*, 279: 149–152.
- HATA, S.; KOUCHI, H.; SUZUKA, I.; ISHII, T. (1991) — Isolation and characterization of cDNA clones for plant cyclins, *EMBO J.*, 10: 2681–2688.
- HEMERLY, A.; BERGOUNIOUX, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; FERREIRA, P. (1992) — Genes regulating the plant cell cycle: isolation of a mitotic-like cyclin from *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3295–3299.

- HEMERLY, A.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; BERGOUNIOUX, C.; VAN MONTAGU, M.; ENGLER, G.; INZÉ, D.; FERREIRA, P. (1995) — Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development, *EMBO J.*, 14: 3925–3936.
- HIRAYAMA, T.; IMAJUKU, Y.; ANAI, T.; MATSUI M.; OKA, A. (1991) — Identification of two cell-cycle-controlling *cdc2* gene homologs in *Arabidopsis thaliana*, *Gene*, 105: 159–165.
- HIRT, H.; MINK, M.; PFOSSER, M.; BÖGRE, L.; GYÖRGYÉY, J.; JONAK, C.; GARTNER, A.; DUDITS, D.; HEBERLE-BORS, E. (1992) — Alfalfa cyclins: differential expression during the cell cycle and in plant organs, *Plant Cell*, 4: 1531–1538.
- HOBBIE, L.J. (1998) — Auxin: molecular genetic approaches in *Arabidopsis*, *Plant Physiol. Biochem.*, 36: 91–102.
- HUNTER, T. (1993) — Braking the cycle, *Cell*, 75: 839–841.
- ITO, M.; MARIE-CLAIRE, C.; SAKABE, M.; OHNO, T.; HATA, S.; KOUCHI, H.; HASHIMOTO, J.; FUKUDA, H.; KOMAMINE, A.; WATANABE, A. (1997) — Cell-cycle-regulated transcription of A- and B-type plant cyclin genes in synchronous cultures, *Plant J.*, 11: 983–992.
- JACOBS, T.W. (1995) — Cell cycle control, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 317–339.
- JAMES, D.J. (1983) — Adventitious root formation 'in vitro' in apple rootstocks (*Malus pumila*) I. Factors affecting the length of the auxin sensitive phase in M.9, *Physiol. Plant.*, 57: 149–153.
- JOHN P.C.L. (1998) — Cytokinin stimulation of cell division: essential signal transduction is via Cdc25 phosphatase, *J. Exp. Bot.*, 49: 91.
- JOHN, P.C.L.; SEK, F.J.; LEE, M.G. (1989) — A homolog of the cell cycle control protein p34^{cdc2} participates in the division cycle of *Chlamydomonas* and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa, *Plant Cell*, 1: 1185–1193.
- JOHN, P.C.L.; ZHANG, K.; DONG, C.; DIEDERICH, L.; WIGHTMAN, F. (1993) — p34^{cdc2} Related proteins in control of cell cycle progression, the switch between division and differentiation in tissue development, and stimulation of division by auxin and cytokinin, *Aust. J. Plant Physiol.*, 20: 503–526.
- KING, R.W.; JACKSON, P.K.; KIRSCHNER, M.W. (1994) — Mitosis in transition, *Cell*, 79: 563–571.
- KOUCHI, H.; SEKINE, M.; HATA, S. (1995) — Distinct classes of mitotic cyclins are differentially expressed in the soybean shoot apex during the cell cycle, *Plant Cell*, 7: 1143–1155.
- KREK, W.; NIGG, E.A. (1991) — Differential phosphorylation of vertebrate p34^{cdc2} kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites, *EMBO J.*, 10: 305–316.
- LEYSER, O. (1997) — Auxin: lessons from a mutant weed, *Physiol. Plant.*, 100: 407–414.
- LUND, S.T.; SMITH, A.G.; HACKETT, W.P. (1997) — Differential gene expression in response to auxin treatment in the wild type and *rac*, an adventitious rooting-incompetent mutant of tobacco, *Plant Physiol.*, 114: 1197–1206.

- MAGYAR, Z.; MÉSZÁROS, T.; MISKOLCZI, P.; DEÁK, M.; FEHÉR, A.; BROWN, S.; KONDOROSI, E.; ATHANASIADIS, A.; PONGOR, S.; BILGIN, M.; BAKÓ, L.; KONCS, C.; DUDITS, D. (1997) — Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells, *Plant Cell*, 9: 223–235.
- MALAMY, J.E.; BENFEY, P.N. (1997) — Down and out in *Arabidopsis*: the formation of lateral roots, *T. in Plant Sci.*, 2: 390–396.
- MARTINEZ, M.C.; JØRGENSEN, J.-E.; LAWTON, M.A.; LAMB, C.J.; DOERNER, P.W. (1992) — Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 7360–7364.
- MESKIENES, I.; BÖGRE, L.; DAHL, M.; PIRCK, M.; HÁ, D.T.; SWOBODA, I.; HEBERLEBORS, E.; AMMERER, G.; HIRT, H. (1995) — *cycMs3*, a novel B-type alfalfa cyclin gene, is induced in the G₀-to-G₁ transition of the cell cycle, *Plant Cell*, 7: 759–771.
- MEWS, M.; SEK F.J.; MOORE R.; VOLKMAN D.; GUNNING, B.E.S.; JOHN, P.C.L. (1997) — Mitotic cyclin distribution during maize cell division: implications for sequence diversity and functions of cyclins in plants, *Protoplasma*, 200: 128–145.
- MIRONOV, V.; VEYLDER, L.D.; VON MONTAGU, M.; INZÉ, D. (1999) — Cyclin-dependent kinases and cell division in plants – the nexus; *Plant Cell*, 11: 509–521.
- MOHNEN, D. (1994) — *Novel experimental systems for determining cellular competence and determination*, in “Biology of Adventitious Root Formation” (T.D. Davis; B.E. Haissing, Eds.), Plenum Press, Nova Iorque, pp. 87–98.
- MONCOUSIN, C. (1991) — Rooting of microcuttings: fundamental aspects, *Acta Hort.*, 289: 311–317.
- MURRAY, J.H.A.; FREEMAN, D.; GREENWOOD, J.; HUNTLEY, R.; MAKKERH, J.; RIOUKHAMLICHI, C.; SORRELL, D.A.; COCKCROFT, C.; CARMICHAEL, J.P.; SONI, R.; SHAH, Z.H. (1998) — *Plant D cyclins and retinoblastoma (rB) plant homologues*, in “Plant Cell Division” (D. Francis; D. Dudits; D. Inzé, Eds.), Portland Press, Londres, pp. 99–127.
- NILSSON, O.; TUOMINEN, H.; SUNDBERG, B.; OLSSON, O. (1997) — The *Agrobacterium rhizogenes rolB* and *rolC* promoters are expressed in pericycle cells competent to serve as root initials in transgenic hybrid aspen, *Physiol. Plant.*, 100: 456–462.
- NURSE, P. (1990) — Universal control mechanism regulating onset of M-phase, *Nature*, 344: 503–508.
- NURSE, P.; BISSET, Y. (1981) — Gene requires in G₁ for commitment to cell cycle and in G₂ for control of mitosis in fission yeast, *Nature*, 292: 558–560.
- PLESSE, B.; FLECK, J.; GENSHIK, P. (1998) — *The ubiquitin-dependent proteolytic pathway and cell cycle control*, in “Plant Cell Division” (D. Francis; D. Dudits; D. Inzé, Eds.), Portland Press, Londres, pp. 145–163.
- QIN, L.-X.; RICHARD, L.; PARENNE, C.; GADAL, P.; BERGOUNIOUX, C. (1995) — Identification of a cell cycle-related gene, cyclin, in *Nicotiana tabacum* L., *Plant Physiol.*, 108: 425–426.
- REED, R.C.; BRADY, S.R.; MUDAY, G.K. (1998) — Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 118: 1369–1378.

- RENAUDIN, J.-P.; DOONAN, J.H.; FREEMAN, D.; HASHIMOTO, J.; HIRT, H.; INZÉ, D.; JACOBS, T.; KOUCHI, H.; ROUZÉ, P.; SAUTER, M.; SAVOURÉ, A.; SORREL, D.A.; SUNDARESAN, V.; MURRAY, J.A.H. (1996) — Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization, *Plant Mol. Biol.*, 32: 1003–1018.
- RENAUDIN, J.P.; SAVOURÉ, A.; PHILIPPE, H.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; ROUZÉ, P. (1998) — *Characterization and classification of plant cyclin sequences related to A- and B-type cyclones*, in “Plant Cell Division” (D. Francis; D. Dudits; D. Inzé, Eds.), Portland Press, Londres, pp. 67–98.
- SAUTER, M. (1997) — Differential expression of a CAK (*cdc2*-activating kinase)-like protein kinase; cyclins and *cdc2* genes from rice during the cell cycle and in response to gibberellin, *Plant J.*, 11: 181–190.
- SCHMÜLLING, T.; SCHELL, J.; SPENA, A. (1988) — Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development, *EMBO J.*, 7: 2621–2629.
- SEGERS, G.; GADISSEUR, I.; BERGOUNIOUX, C.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; JACQMARD, A.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ D. (1996) — The *Arabidopsis* cyclin-sepdependent kinase gene *cdc2bAt* is preferentially expressed during S and G2 phases of the cell cycle, *Plant J.*, 10: 601–612.
- SETIANDY, Y.Y.; SEKINE, M.; HARIGUCHI, N.; YAMAMOTO, T.; KOUCHI, H.; SHINMYO, A. (1995) — Tobacco mitotic cyclins: cloning, characterization, gene expression and functional assay, *Plant J.*, 8: 949–957.
- SITBON, F.; PERROT-RECHERMANN, C. (1997) — Expression of auxin-regulated genes, *Physiol. Plant.*, 100: 443–455.
- SMITH, D.L.; FEDOROFF, N.V. (1995) — *LRP1*, a gene expressed in lateral and adventitious root primordia of *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 7: 735–745.
- SONI, R.; CARMICHAEL, J.P.; SHAH, Z.H.; MURRAY, J.A.H. (1995) — A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif, *Plant Cell*, 7: 85–103.
- SORRELL, D.A.; COMBETTES, B.; CHAUBET-GIGOT, N.; GIGOT, S.; MURRAY, J.A.H. (1999) — Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco Bright Yellow-2 cells, *Plant Physiol.*, 119: 343–351.
- SPENA, A.; SCHMÜLLING, T.; KONCZ, C.; SCHELL, J.S. (1987) — Independent and synergistic activity of *rol A*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants, *EMBO J.*, 6: 3891–3899.
- SUNDARESAN, V.; COLASANTI, J. (1998) — *Cyclin-dependent kinases in higher plants: spatial and temporal control of cell division*, in “Plant Cell Division” (D. Francis; D. Dudits; D. Inzé D., Eds.), Portland Press, Londres, pp. 47–65.
- TIMPTE, C.; PICKETT, F.B.; TURNER, J.; ESTELLE, M. (1995) — The *AXR1* and *AUX1* genes of *Arabidopsis* function in separate auxin-response pathways, *Plant J.*, 8: 561–569.
- TRÉHIN, C.; AHN, I.-O.; PERENNES, C.; COUTEAU, F.; LALANNE, E.; BERGOUNIOUX, C. (1997) — Cloning of upstream sequences responsible for cell cycle regulation of the *Nicotiana sylvestris CycB:1* gene, *Plant Mol. Biol.*, 35: 667–672.

- UMEDA, M.; UMEDA-HARA, C.; YAMAGUCHI, M.; HASHIMOTO, J.; UCHIMIYA, H. (1999) — Differential expression of genes for cyclin-dependent protein kinases in rice plants, *Plant Physiol.*, 119: 31–41.
- VERA, P.; LAMB, C.; DOERNER, P. (1994) — Cell-cycle regulation of hydroxyproline-rich glycoprotein *HRGPnt3* gene expression during the initiation of lateral root meristems, *Plant J.*, 6: 717–727.
- WANG, H.; QI, Q.; SCHORR, P.; CUTLER, A.J.; CROSBY, W.L.; FOWKE, L.C. (1998) — ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3 and its expression is induced by abscisic acid, *Plant J.*, 15: 501–510.
- WIGHTMAN, F.; THIMANN, K.V. (1980) — Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots I: Sources of primordia-inducing substances in the primary root of pea seedlings, *Physiol. Plant.*, 49: 13–20.
- ZIMMERMAN, R.H.; HACKETT, W.P.; PHARIS, R.P. (1985) — *Hormonal aspects of phase change and precocious flowering*, in “Hormonal Regulation of Development III: Role of environmental factors” (R.P. Pharis; D.M. Reid, Eds.), Springer, Nova Iorque, pp. 79–115.