

# Aprendendo com as Agrobactérias



Das plantas transgênicas aos mecanismos de crescimento e desenvolvimento vegetal

## Leila Maria Gomes Barros

PhD. Biologia Molecular  
Pesquisadora  
Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia  
leila@cenargen.embrapa.br

## Antônio Américo Barbosa Viana

M.Sc. em Biologia Molecular  
Consultor  
Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia  
aamerico@cenargen.embrapa.br

## Mauro Carneiro

Ph.D. Biologia Molecular  
Pesquisador  
Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia  
mauro@cenargen.embrapa.br

## As agrobactérias e a colonização genética

Os mecanismos de interação planta-patógeno são extremamente complexos e diversificados. Entre os diferentes tipos de parasitismo, o que utiliza a transferência de material genético como estratégia de colonização é um dos mais intrigantes, tendo sido descritos nos vírus e agrobactérias. Os vírus utilizam o sistema de transcrição e tradução da célula hospedeira para produzir suas próprias proteínas, o que permite a sua multiplicação, debilitando o hospedeiro e culminando, geralmente, em sua morte. As agrobactérias, por sua vez, transferem parte de seu material genético para o genoma da planta hospedeira, mecanismo este denominado de Coloniza-

ção Genética (Schell *et al.*, 1979). Os genes transferidos são replicados, transcritos e traduzidos como se fossem da própria célula vegetal, resultando no desenvolvimento de tumores ou raízes adventícias no sítio de infecção, conhecidos como galha de coroa (“crown gall”) ou raízes em cabeleira (“hairy root”), respectivamente (Figura 1). As células neoplásicas sintetizam e excretam compostos derivados de aminoácidos e açúcares, denominados opinas, que servem de nutrientes apenas para a agrobactéria (Petit *et al.*, 1983). Em outras palavras, a célula vegetal é “subjugada” para produzir nutrientes para a agrobactéria invasora que, desta forma, obtém carbono e nitrogênio sem competir com as demais bactérias do solo.

Os primeiros estudos sobre agrobactéria datam do início do século XX quando Smith e Townsend (1907) isolaram uma bactéria de galha de coroa de *Chrysanthemum frutescens* (margarida) e demonstraram que ela também causa tumores em vários outros vegetais, sendo denominada de *Bacterium tumefaciens*. Riker e colaboradores (1930) demonstraram que a proliferação de raízes em cabeleira, também é causada por uma bactéria, por eles nomeada *Phytomonas rhizogenes*. Mais tarde, Conn (1942) agrupou as duas espécies em um novo gênero denominado *Agrobacterium*.

Hoje, o gênero *Agrobacterium* encontra-se agrupado na família Rhizobiaceae, juntamente com o gênero *Rhizobium*, que são bactérias de solo, Gram-negativas, causadoras de neoplasias em plantas (Buchanan &

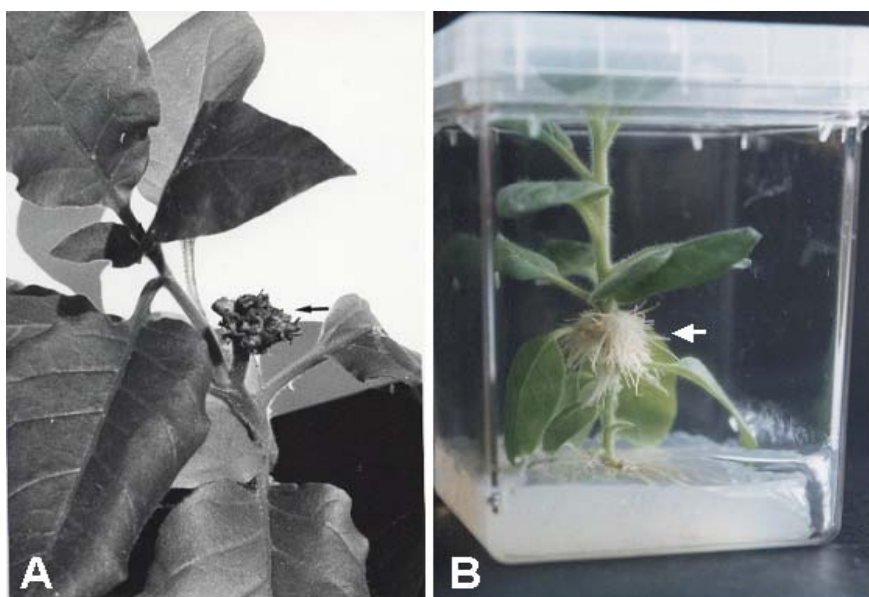


Figura 1. Plantas de *Nicotiana tabacum* infectadas com (A) *Agrobacterium tumefaciens*, onde pode ser vista uma galha de coroa, e (B) *A. rhizogenes*, com raízes em cabeleira *in vitro*.

Gibbons, 1975). O gênero *Rhizobium* é composto por bactérias fixadoras de nitrogênio que estimulam nódulos nas raízes de leguminosas, diferentemente das neoplasias causadas por agrobactérias.

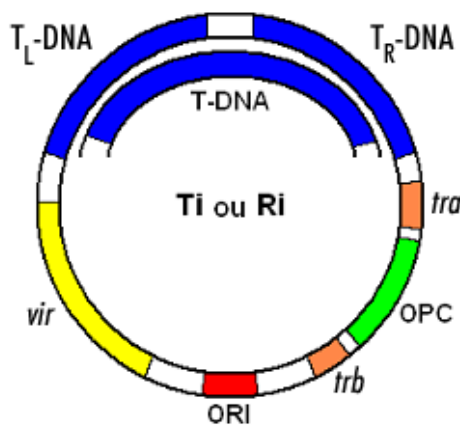
As agrobactérias infectam inúmeras dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas (De Cleene & De Ley, 1976; Porter, 1991) apresentam temperatura ótima de crescimento entre 25-30 °C e somente se estabelecem, em condições naturais, em locais injuriados da planta (Buchanan & Gibbons, 1975). Devido a estas características, as galhas de coroa e raízes em cabeleira são doenças importantes em regiões de clima temperado, especialmente em viveiros de fruteiras (parreiras, amendoeiras, ameixeiras, macieiras e pessegueiros) que são propagadas vegetativamente ou por enxertia. Os ferimentos, resultantes da manipulação das plantas, favorecem a instalação da agrobactéria (Hildebrand, 1934; Kerr, 1969a).

No Brasil, segundo Beriam e colaboradores (1996), os primeiros trabalhos sobre infecção de plantas por agrobactéria foram feitos por Costa Neto em 1937, que relata ser a galha bacteriana do pessegueiro (*Prunus persica*) uma doença comum no Estado do Rio Grande do Sul. Nos anos seguintes, as galhas de coroa foram citadas em muitas culturas tais como castanheiro (*Castanea sativa*), videira (*Vitis vinifera*), ameixeira (*Prunus domestica*), alface (*Lactuca sativa*), chuchu (*Sechium edule*), mandioca (*Manihot esculenta*), urucum (*Bixa orellana*), etc. (Beriam *et al.*, 1996). Romeiro e colaboradores (1994) reportam que nas culturas de roseiras (*Rosa* spp.) na região de Barbacena, Estado de Minas Gerais, as galhas agrobacterianas são responsáveis pela queda de 20 a 100% da produção de botões florais comercializáveis.

### O mecanismo molecular de interação Agrobacterium-Planta

O fato de a agrobactéria alterar o programa de desenvolvimento das plantas hospedeiras, induzindo a formação de tumores ou raízes, atraiu a curiosidade dos cientistas, resultando em avanços do conhecimento nesta

área. O primeiro grande passo no sentido de elucidar o mecanismo de infecção foi dado quando White & Braun (1943) demonstraram que as galhas de coroa poderiam crescer indefinidamente *in vitro*, na ausência da bactéria, lançando a hipótese da existência de um princípio indutor de tumor ("tumour-inducing principle - t.i.p."). Desde então, várias outras importantes descobertas somaram-se no sentido de solucionar este intrigante mecanismo de infecção. Kerr (1969b) observou que a virulência de uma cepa de *Agrobacterium* fitopatogênica poderia ser transferida para uma cepa saprofítica (*A. radiobacter*). Petit e colaboradores (1970) demonstraram que a cepa que induz a síntese da opina Octopina nas células tumorais usa esse produto, seletivamente, como fonte de carbono e nitrogênio, mas não uma outra opina como a Nopalina, sugerindo que a informação genética para a síntese da opina seja transferida da agrobactéria para a planta. Mais tarde, foi demonstrado que um elemento não cromossomal é responsável pela virulência das agrobactérias, sendo denominado de plasmídeo Ti ("Tumor inducing") em *A. tumefaciens* (Van Larebeke *et al.*, 1974) e plasmídeo Ri ("Root inducing") em *A. rhizogenes* (Moore *et al.*, 1979). Essas descobertas culminaram na

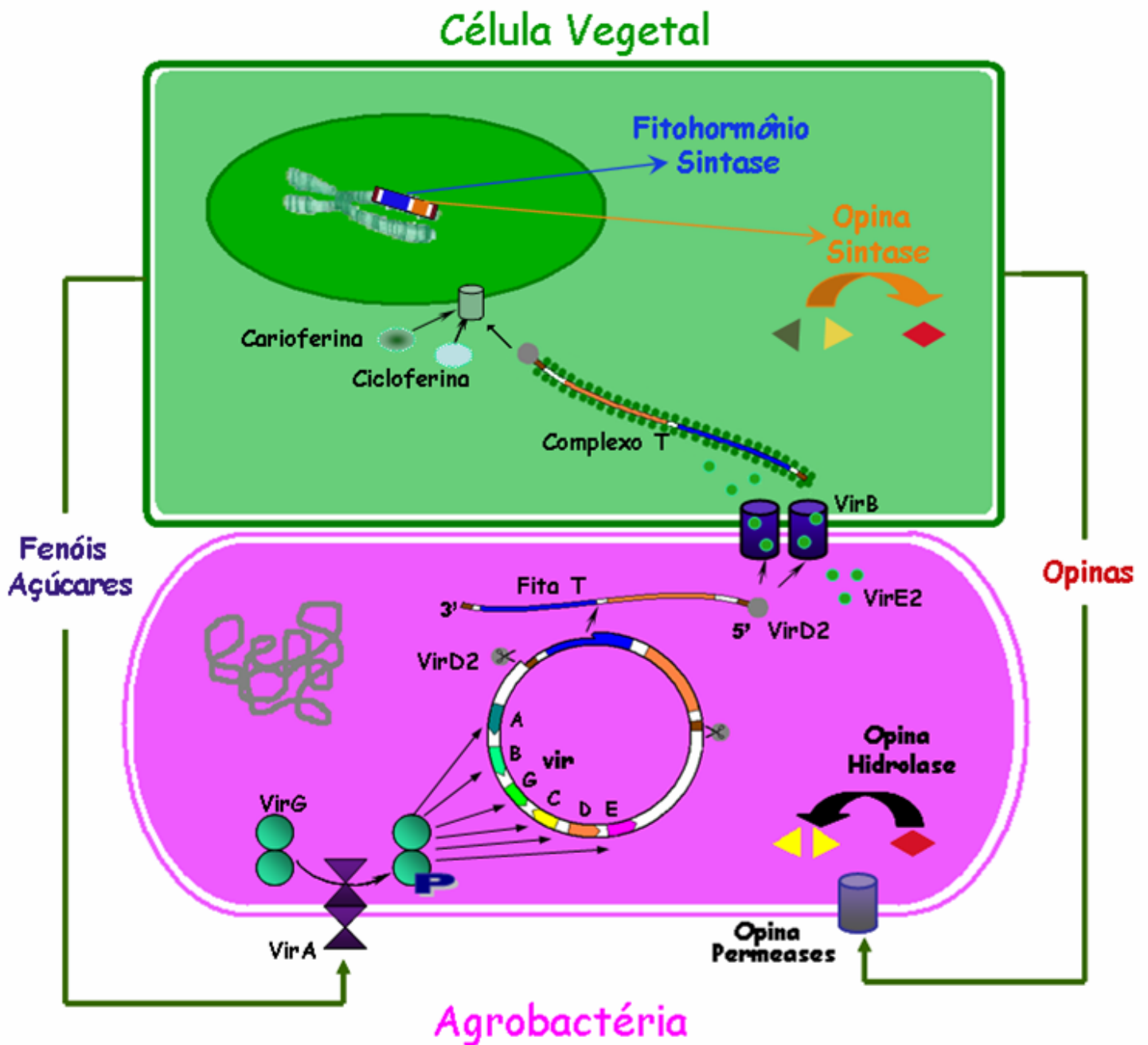


**Figura 2.** Plasmídeo Ti ou Ri de *Agrobacterium tumefaciens* ou *A. rhizogenes*, respectivamente. T-DNA: região transferida, que pode se apresentar como um único segmento ou em dois segmentos, T<sub>L</sub> e T<sub>R</sub>-DNA; tra e trb: regiões responsáveis pela conjugação bacteriana; OPC: região responsável pelo catabolismo de opinas, e vir: codifica proteínas associadas ao processo de transferência do T-DNA para a célula hospedeira.

elucidação do mecanismo de infecção: a transferência de um segmento do plasmídeo Ti ou Ri (T-DNA) da *Agrobacterium* para o genoma vegetal (Chilton *et al.*, 1977; Chilton *et al.*, 1982; White *et al.*, 1982).

O Ti e o Ri são plasmídeos grandes, variando de 200 a mais de 800Kb, apresentando estrutura modular, onde genes de função similar encontram-se agrupados, resultando em cinco regiões definidas (Zhu *et al.*, 2000) (Figura 2): (i) T-DNA ("transfer DNA"): região do plasmídeo transferida para a planta, codifica os genes indutores de tumores ou raízes e genes responsáveis pela síntese das opinas (octopina, nopalina, manopina, agropina etc.). (ii) região *vir*: dirige o processamento e transferência do T-DNA para a célula hospedeira; (iii) região *rep*: responsável pela replicação do plasmídeo; (iv) regiões *tra* e *trb*: dirigem o mecanismo de conjugação entre agrobactérias; e (v) região *opc*: envolvida na absorção e catabolismo das opinas.

O mecanismo de transferência do T-DNA para a célula vegetal já está quase totalmente elucidado. A Figura 3 apresenta todos os passos para o estabelecimento da infecção. Quando um vegetal sofre uma injúria, um exudado composto de fenóis e açúcares é secretado, servindo de proteção e início da cicatrização do ferimento. A agrobactéria, atraída por estes compostos, chega ao local do ferimento. Os seus genes cromossomais conhecidos como *chvA*, *chvB*, *chvD*, *chvE*, *chvG*, *chvI*, *pscA*, *att*, *miaA*, *ros*, e *acuB* codificam proteínas envolvidas no reconhecimento do exudado e no contato entre a agrobactéria e a célula hospedeira (Matthysse *et al.*, 1981; Douglas *et al.*, 1982; Tzfira *et al.*, 2000). Os compostos fenólicos presentes no exudado, principalmente a acetossiringona, também ativam a região de virulência "*vir*" através da estimulação da proteína VirA, uma quinase localizada na membrana da agrobactéria que fosforila outra proteína bacteriana, a VirG que, por sua vez, estimula a transcrição das proteínas de todos os seis operons *Vir* (A, B, C, D, E e G) (Stachel *et al.*, 1986b; Winans *et al.*, 1989; Joubert *et al.*, 2002). Sugere-se, ainda, que a transferência do T-DNA para a célula vegetal ocorra por



**Figura 3.** Interação molecular agrobactéria-planta. A planta que sofreu injúria produz compostos fenólicos e açúcares que são captados pela proteína VirA, que fosforila a VirG que, por sua vez, ativa os demais genes *vir*. A VirD2 cliva as bordas do T-DNA e o direciona para a célula hospedeira através de canais formados pela VirB. Já na célula vegetal, as proteínas VirE2 se ligam à fita-T formando o complexo T. Este complexo, então, entra no núcleo da célula vegetal com o auxílio das carioferinas e cicloferinas do próprio hospedeiro, e integra no genoma da planta. Desta forma, a planta passa a produzir fitormônios e opinas que servem de nutriente para a agrobactéria.

Adaptada de Zhu *et al.*, 2000, por Marlene T. De-Souza e Antônio Américo B.Viana.

mecanismo semelhante à conjugação bacteriana. Inicia-se com a clivagem das bordas de uma das fitas do T-DNA pelas endonucleases sítio específicas VirD1 e VirD2 (Wang *et al.*, 1987). Subseqüentemente, uma nova fita de DNA é sintetizada, iniciando na borda direita e prosseguindo na direção da borda esquerda (Stachel *et al.*, 1986a; Yanofsky *et al.*, 1986). Um T-DNA de fita simples, chamado de fita T, é

liberado no processo, no qual a proteína VirD2 permanece covalentemente ligada até seu destino final, que é o núcleo da célula vegetal (Herrera-Estrella *et al.*, 1988). A fita T, com a proteína VirD2 e outra proteína a VirE2, são translocados da agrobactéria para a célula vegetal através de um canal semelhante ao “pilus” conjugativo estabelecido entre a agrobactéria e a célula vegetal por proteínas codifica-

das no operon VirB (Baron & Zambryski, 1996; Christie PJ, 1997). No citoplasma da célula vegetal, várias proteínas VirE2 juntam-se à fita T formando um complexo T-DNA/proteínas (complexo T) que é transportado para o núcleo, com ajuda das proteínas da célula vegetal carioferina alfa e cicloferinas (Zupan *et al.*, 1996; Gelvin, 2000). Uma vez no núcleo, o T-DNA é integrado no genoma vegetal por recombinação

**Tabela 1.** Exemplos de plasmídeos Ti e Ri

Plasmídeo	T-DNA	Opina sintetizada	Referência Bibliográfica
Ti	T-DNA	Nopalina	Holsters et al., 1980,
Ri	T-DNA	Manopina ou Cucumopina	Hansen et al., 1991
Ti	T <sub>L</sub> e T <sub>R</sub> -DNA	Octopina	Ooms et al., 1982
Ri	T <sub>L</sub> e T <sub>R</sub> -DNA	Agropina	Jouanin, 1984

ilegítima, preferencialmente em locais ativos do genoma (Mayerhofer *et al.*, 1991; Thomashow *et al.*, 1980). Os genes do T-DNA são então expressos pela planta. Aqueles que codificam enzimas responsáveis pela síntese de fitohormônios levam à diferenciação e proliferação celular e, os que codificam para as opinas sintases produzem nutrientes para as bactérias colonizadoras.

### Da agrobactéria, engenheira genética natural, às plantas transgênicas atuais.

A descoberta de que a agrobactéria é capaz de introduzir no genoma da célula vegetal um segmento do seu próprio plasmídeo, que altera o programa de desenvolvimento e o metabolismo da célula vegetal em seu favor, em uma troca não convencional de material genético, lançou as bases da Transformação Genética Vegetal.

O entendimento dos mecanismos de transferência do T-DNA para a célula vegetal, aliado a Tecnologia de DNA Recombinante e a Cultura de Tecidos Vegetais, resultou no desenvolvimento das plantas transgênicas. O homem, observando as agrobactérias, tornou-se capaz de fazer com que as plantas produzam compostos do seu interesse. No entanto, modificações no T-DNA tiveram que ser feitas, de forma que os genes responsáveis pela síntese dos fitohormônios e das opinas fossem retirados, resultando no chamado plasmídeo Ti desarmado. Neste local, genes de interesse podem ser inseridos, incluindo genes que conferem à célula transformada uma característica passível de seleção. Desta forma, o Ti com o T-DNA alterado é introduzido

de volta na agrobactéria, que é utilizada no processo de transformação. O tecido alvo da transformação é colocado em contato com a agrobactéria contendo o novo Ti e, subsequentemente, cultivado em meio que favoreça a regeneração de plantas, em presença do agente seletivo, de forma a permitir a regeneração apenas das células transformadas, ou seja, aquelas que incorporaram o T-DNA. Deste modo, a planta regenerada contém em seu genoma uma ou mais cópias do T-DNA, que serão transmitidas para as futuras gerações por meiose, obedecendo às leis de Mendel (Tepfer, 1984). As primeiras plantas transgênicas obtidas utilizando-se *A. tumefaciens* como vetor de transformação foram plantas de *Nicotiana tabacum*. Inicialmente, foram utilizados protoplastos de células do mesófilo para a transformação (De Block *et al.*, 1984; Horsch *et al.*, 1984) e, em seguida, passou-se a utilizar discos foliares (Horsch *et al.*, 1985). Protoplastos ou discos foliares foram co-cultivados com a agrobactéria, contendo no T-DNA o gene *nptIII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina. Depois de várias semanas de cultivo em meio propício à regeneração, contendo canamicina, foram obtidas plantas transformadas resistentes ao antibiótico. Atualmente, em experimentos de transformação, o co-cultivo com segmentos foliares é utilizado preferencialmente, devido à simplicidade da manipulação.

### O T-DNA

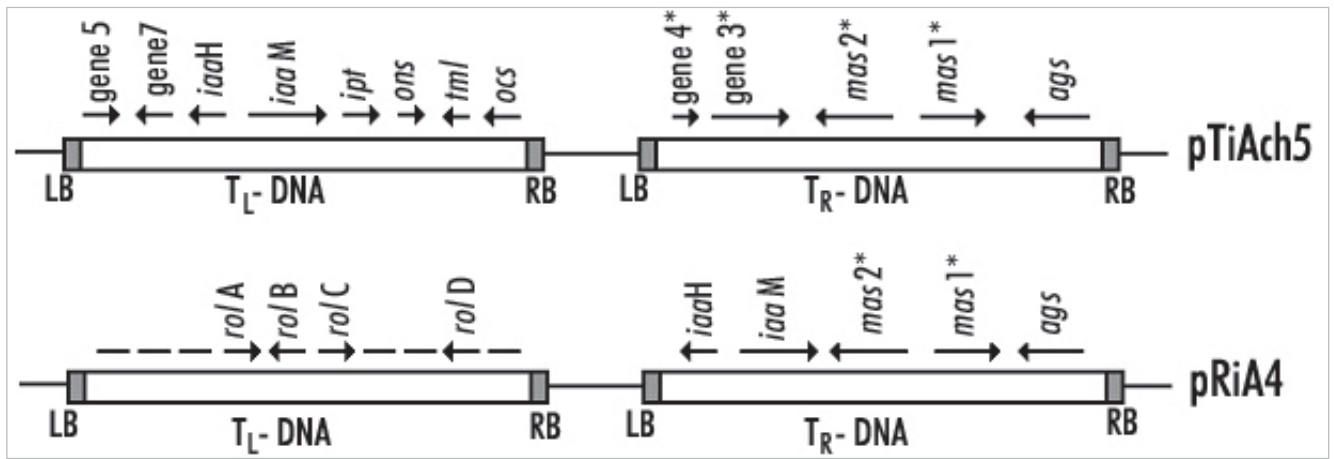
O T-DNA pode ser encontrado como um único segmento de aproximadamente 20 kb, ou dividido em dois segmentos, com até 20 kb cada, separados por pelo menos 15 kb de

DNA não integrativo (White *et al.*, 1985), dependendo da linhagem bacteriana. A Tabela 1 mostra alguns exemplos de plasmídeos Ti e Ri especificando o tipo de T-DNA e a principal opina resultante.

Cada Região T é delimitada em ambas extremidades por uma seqüência de 25 pb, disposta na mesma orientação, chamada de borda esquerda e borda direita ("LB e RB") (Wang *et al.*, 1984). Embora os genes do T-DNA sejam provenientes de um organismo procarioto, eles contêm seqüências regulatórias eucarióticas, como TATA box, CAAT box, "enhancers" e um sítio para adição da seqüência de poliadenina, que são reconhecidos pela RNA polimerase II da célula vegetal (Willmitzer *et al.*, 1981). Desta maneira, a agrobactéria pode utilizar a maquinaria de expressão gênica do hospedeiro para expressar seus genes e, conseqüentemente, manipular a fisiologia das plantas em seu favor.

A exata organização dos genes dentro do plasmídeo Ti somente foi conhecida após seu completo seqüenciamento, realizado por Zhu e colaboradores (2000). Este trabalho mostrou que o T<sub>L</sub>-DNA e T<sub>R</sub>-DNA do plasmídeo Ti da família octopina, possui 13 e 7,8 Kb, respectivamente, codificando um total de 13 prováveis genes. Esses genes são responsáveis pela proliferação das células neoplásicas e produção de opinas.

No T<sub>L</sub>-DNA foi caracterizado o locus *tms* ("tumour morphology shoot"), que, quando inativado, provoca o aparecimento de brotos nos tumores (Garfinkel *et al.*, 1981; Ooms *et al.*, 1981). Este locus possui dois genes, o gene *iaaM* também chamado de *gene1*, *tms1*, *aux1* ou *shi* (Thomashow *et al.*, 1986; Van Onckelen *et al.*, 1986) e o *iaaH* também conhecido como *gene2*, *tms2*, *aux2* ou *shi* (Schröder *et al.*, 1984; Thomashow *et al.*, 1984). Eles codificam enzimas responsáveis pela conversão do triptofano via indolacetamida em ácido indol-3-acético (AIA), resultando em uma nova rota de produção da auxina endógena mais abundante, envolvida em vários processos do desenvolvimento vegetal. No T<sub>L</sub>-DNA também foi caracterizado o locus *tmr* ("tumour morphology root") que, quan-



**Figura 4.** T-DNA da *A. tumefaciens* (pTiAch5) e da *A. rhizogenes* (pRiA4). Ambos possuem genes codificadores de hormônios vegetais (*iaaM*, *iaaH*, *ipt* e *tml*) e de síntese de opinas (*ocs*, *ags*, *mas1* e *mas2*). Somente a *A. rhizogenes* possui os genes responsáveis pela indução da formação de raízes (*rolA*, *rolB*, *rolC* e *rolD*).

do inativado, produz tumores com raízes. Este locus contém apenas um gene o *ipt*, também conhecido como *gene4*, *tmr* ou *roi* que catalisa a síntese da citocinina iso-penteniladenosina 5'-monofosfato a partir de dimetilalilpirofosfato e 5'AMP (Akiyoshi *et al.*, 1984; Barry *et al.*, 1984; Buchmann *et al.*, 1985). Aparentemente, enzimas da planta hospedeira convertem iso-penteniladenosina 5'-monofosfato na citocinina zeatina. As citocininas são hormônios que regulam o desenvolvimento vegetal de forma antagônica às auxinas. Dois outros genes, encontrados no T<sub>L</sub>-DNA do plasmídeo Ti, são também responsáveis pela formação da galha de coroa: o *gene5* ou *ila*, que é responsável pela síntese do composto indol-3-lactato, um antagonista da auxina (Körber *et al.*, 1991) e, o *gene6b* ou *tml*, que confere às células transformadas um aumento de sensibilidade à auxina, por um mecanismo ainda não identificado (Hooykaas *et al.*, 1988; Tinland *et al.*, 1992). No T<sub>L</sub>-DNA também existem genes responsáveis pelo metabolismo das opinas. Um deles é o gene *ocs*, que codifica a enzima octopina sintase, responsável pela condensação do piruvato com quatro aminoácidos básicos, arginina, lisina, histidina ou ornitina, dando origem opinas octopina, lisopina, histopina ou ácido octopínico, respectivamente (De Greve *et al.*, 1982). Outro gene caracterizado é o *nos*, que codifica uma proteína responsável pela secreção das opinas (Messens *et al.*, 1985) (Figura 4).

No T<sub>R</sub>-DNA deste plasmídeo Ti

foram identificados três outros genes responsáveis pela produção das opinas são eles o *mas2*, cujo produto é o responsável pela condensação do ácido glutâmico com a glicose formando o precursor desoxifruetosilglutamina, e o *mas1*, responsável pela redução do precursor, formando a opina manopina (Dessaux *et al.*, 1998). O outro gene é o *ags*, cujo produto catalisa a lactonização da manopina resultando na agropina (Dessaux *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 1997). Dois outros possíveis genes foram identificados no T<sub>L</sub>-DNA da família octopina, o *gene3* e o *gene4*, cujas funções ainda não foram determinadas. Portanto, os plasmídeos do tipo octopina produzem diferentes tipos de opinas.

No caso da *A. rhizogenes*, em contraste com o *A. tumefaciens*, ocorre a indução de um tecido neoplásico organizado na forma de raízes adventícias (Figura 1). Não obstante, existe uma significativa homologia do T<sub>R</sub>-DNA do plasmídeo Ri com o T-DNA do plasmídeo Ti, como por exemplo, os genes de síntese de auxina *iaaM* e *iaaH* e, os genes *mas1*, *mas2* e *ags*, responsáveis pela síntese das opinas (White *et al.*, 1985). Em contraste, o T<sub>L</sub>-DNA do plasmídeo RiA4, possui 18 regiões abertas para leitura (ORFs) (Slightom *et al.*, 1986) com baixa homologia com o plasmídeo Ti da família octopina (Nilsson & Olsson, 1997). Quatro destes genes, específicos dos plasmídeos Ri, são considerados responsáveis pela indução das raízes em cabeleira (White *et al.*, 1985; Spena *et al.*, 1987) (Figura 4). Esse

locus foi denominado de locus de raiz (*root locus*) cujos genes foram designados de *rolA*, *rolB*, *rolC* e *rolD* (White *et al.*, 1985), correspondendo as ORFs 10, 11, 12 e 15, respectivamente (Slightom *et al.*, 1986).

Diferentemente dos tumores, as raízes neoplásicas provêm de uma única célula transformada e podem regenerar plantas férteis, quando cultivadas *in vitro*. Essas plantas apresentam fenótipo alterado, cujos principais sintomas são: nanismo, enrugamento foliar, formação de raízes adventícias e plagiotrópicas, dominância apical reduzida, alteração na morfologia floral, redução do número de sementes, entre outros (Tepfer, 1984). Assim como a descoberta da transferência do T-DNA para a célula vegetal levou ao desenvolvimento das plantas transgênicas, o entendimento dos mecanismos pelos quais as agrobactérias alteram a morfologia da planta pode ser útil nos estudos de Biologia do Desenvolvimento e Fisiologia Vegetal, bem como na manipulação de características agrônomicas de interesse.

#### Os oncogenes *rolA*, *rolB*, *rolC* e *rolD*

Como os genes *rol* participam da estratégia de colonização, estabelecida no decorrer da evolução planta/patógeno? Qual é o papel de cada gene na síndrome de raiz em cabeleira? As respostas para estas perguntas ainda não são totalmente conhecidas.

No entanto, sabemos que os genes *rol* atuam de maneira sinérgica e que, quando expressos em pares, provocam efeitos mais acentuados do que quando expressos isoladamente (Spena *et al.*, 1987). Isto sugere uma certa redundância funcional, que pode ser interpretada como um modo de garantir o sucesso no processo de infecção.

O gene *rolB* (ORF11) é o mais eficiente na indução das raízes e o único gene do T-DNA que, quando inativado, suprime a indução de raízes nas plantas infectadas pela *A. rhizogenes*, exceto em plantas de fumo (White *et al.*, 1985). De fato, *A. rhizogenes* contendo apenas o gene *rolB* é capaz de induzir raízes tão bem quanto cepas selvagens (Spena *et al.*, 1987; Capone *et al.*, 1989). O gene *rolB* expresso em plantas promove alterações na morfologia das folhas e flores, o desenvolvimento de raízes adventícias no caule (Schmülling *et al.*, 1988) e a indução de raízes em segmentos foliares cultivados, *in vitro*, na ausência de auxina. Essas observações levaram a conclusão de que plantas transformadas com *rolB* apresentam um estado hiperauxínico (Capone *et al.*, 1989).

A proteína RolB contém 259 aminoácidos com massa molecular de 30KDa, não possuindo nenhum motivo típico ou similar a proteínas conhecidas. Primeiramente, foi sugerido que RolB provocaria um aumento da concentração de auxina, resultado da hidrólise dos conjugados inativos do ácido indol acético (AIA), liberando auxina ativa na célula (Estruch *et al.*, 1991b). Porém, plantas de fumo expressando o gene *rolB* sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV35S) (Odell *et al.*, 1985) não apresentam níveis alterados de AIA ou AIA-conjugado (Nilsson *et al.*, 1993). A segunda hipótese é que RolB aumentaria a sensibilidade da célula para o AIA, e não a sua disponibilidade, como sugerido anteriormente. Protoplastos de plantas transgênicas de fumo expressando RolB são até 100000 vezes mais sensíveis à auxina do que plantas controle (Maurel *et al.*, 1991). Corroborando este resultado, foi observado que preparações de membrana plasmática de

células transformadas com *rolB* são capazes de ligar mais auxina do que membranas de plantas controle, e que esta ligação é completamente abolida na presença de anticorpos anti-RolB (Filippini *et al.*, 1994). Além disso, protoplastos 35S::*rolB* se dividem e formam calos na ausência de auxina (Walden *et al.*, 1993), e calos gerados a partir de raiz de plantas 35S::RolB tornam-se necróticos em um terço da concentração de auxina necessária para induzir a mesma resposta em calos controle (Schmülling *et al.*, 1993). Os efeitos de *rolB* na organogênese foram estudados utilizando cultura de camada fina de células (TCL), onde foi observado que *rolB* não somente induz a formação meristemas radiculares, mas também meristemas florais (Altamura *et al.*, 1994). Recentemente, Altamura (2004) propôs um modelo no qual *rolB* induziria a formação de meristemas, sendo que o tipo de meristema resultante depende do balanço hormonal local. Apesar dos efeitos da proteína RolB serem bem conhecidos, ainda existem controvérsias quanto ao seu modo de ação. Filippini e colaboradores (1994) demonstraram que a proteína RolB possui atividade tirosina fosfatase, e a localizaram em membrana plasmática das células transformadas, sugerindo uma função de receptor ou transdutor de sinal da via do hormônio AIA. No entanto, Moriuchi e colaboradores (2004) localizaram a proteína quimérica GFP::*rolB* no núcleo de células transformadas, o que favorece a função de transdutor de sinais.

O gene *rolC* (ORF 12), cuja proteína possui 180 aminoácidos com massa molecular de 20 KDa, também não possui homologia com proteínas conhecidas. A proteína RolC foi imunolocalizada no citosol das células transformadas (Estruch *et al.*, 1991a; Oono *et al.*, 1987). As plantas transgênicas de fumo expressando RolC são menores, ramificadas, com folhas afiladas e redução do conteúdo de clorofila. A floração ocorre mais cedo com flores pequenas e redução do número de grãos de pólen (Oono *et al.*, 1987; Schmülling *et al.*, 1988). A função da proteína RolC ainda não foi determinada, tendo sido descrito um aumento de citocinina ZR nas regiões

apicais (Nilsson *et al.*, 1996), sugerindo que RolC influencia positivamente a síntese de citocinina em folhas jovens. Foi observado, ainda, uma diminuição dos níveis de giberilina (GA) em plantas expressando o gene *rolC* devido, provavelmente, à inibição da conversão do GA<sub>19</sub> para o GA<sub>20</sub> (Nilsson *et al.*, 1993, 1996). No entanto, a aplicação de GA exógeno em plantas expressando a proteína RolC reflete somente no aumento do tamanho das plantas, não revertendo os outros fenótipos, tornando evidente que o decréscimo de GA é um efeito secundário (Schmülling *et al.*, 1993).

O gene *rolD* (ORF15) codifica uma proteína de 344 aminoácidos (Slightom *et al.*, 1986). *A. rhizogenes* contendo no locus *rol* apenas o gene *rolD* é incapaz de induzir a formação de raízes em plantas de fumo (Mauro *et al.*, 1996). Por outro lado, *A. rhizogenes* contendo mutações apenas no gene *rolD* induz o desenvolvimento de raízes, porém, as raízes resultantes são pequenas (White *et al.*, 1985). A proteína RolD provoca a floração precoce em plantas de fumo e a potenciação da organogênese floral em culturas de células (Mauro *et al.*, 1996; Altamura, 2004). Em 2001, Trovato e colaboradores demonstraram que o produto protéico deste gene é a enzima ornitina ciclodesaminase (OCD), que converte ornitina em prolina. Existem evidências de que a prolina atue como um indutor da floração.

O gene *rolA* (ORF10) é, entre os genes *rol*, o que causa maiores alterações morfológicas em plantas, sendo este objeto de estudo em nosso laboratório. *A. rhizogenes* contendo apenas o gene *rolA* é capaz de induzir raízes em *N. tabacum*, mas não em outras plantas testadas (Spena *et al.*, 1987). Plantas de fumo transformadas com o gene *rolA* apresentam redução do porte, folhas enrugadas, arredondadas e verdes escuras, atraso na floração, (Figura 5), sistema radicular pobre, reduzido número de flores e retardo na senescência (Schmülling *et al.*, 1988; Sinkar *et al.*, 1988; Slightom *et al.*, 1986; Carneiro & Vilaine, 1993). Da mesma forma, foram observadas alterações fisiológicas tais como redução de giberilina GA<sub>1</sub> (Dehio *et al.*, 1993;

Moritz & Schmülling 1998) e redução da síntese de poliaminas, através de interferência na via da ornitina (Burtin *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1991; Ben-Hayyim *et al.*, 1996). Plantas de fumo expressando *rolA*, quando tratadas com giberilina, não reverterem completamente o fenótipo (Dehio *et al.*, 1993; Schmülling *et al.*, 1993), o que sugere que esta redução de giberelina represente um efeito secundário. Curiosamente, plantas transgênicas com reduzido nível de AIA apresentam fenótipo semelhante a plantas *rolA* (Romano *et al.*, 1991), sendo especulado que o fenótipo *rolA* seja o resultado de um aumento da relação citocinina/auxina. Em consonância com esta hipótese, nanismo, folhas enrugadas e verdes escuras são fenótipos típicos de plantas com alta produção de citocininas (Eklöf *et al.*, 1996).

A expressão do gene *rolA* em plantas transgênicas mostrou que seu promotor é ativo, essencialmente, em todos os órgãos (Schmülling *et al.*, 1989). Carneiro & Vilaine (1993) mostraram que o nível do RNA mensageiro é maior no caule, cinco vezes menor na folha e cinquenta vezes menor na raiz, e que, além disso, o promotor do gene é composto por módulos que determinam a expressão tecido específica.

A proteína RolA possui 100 aminoácidos com massa molecular estimada em torno de 11,4 kDa e ponto isoelétrico de 11,2 (Slightom *et al.*, 1986). Análises computacionais mostraram que não existe similaridade da RolA com proteínas conhecidas. Devido à sua natureza extremamente básica e à presença do motivo SPXX encontrado em proteínas regulatórias, a possibilidade de interação com ácidos nucléicos foi proposta (Levesque *et al.*, 1988; Hansen *et al.*, 1994). Alternativamente, foi sugerido uma função de receptor ou transdutor de sinal de auxinas na membrana plasmática (Maurel *et al.*, 1991; Vansuyt *et al.*, 1992). Experimentos de fracionamento celular de plantas de fumo transformadas com o gene *rolA::gus* indicam que a proteína RolA estaria associada, preferencialmente, à fração da membrana plasmática, embora a atividade do gene repórter *gus*

tenha sido detectada em outras frações celulares (Vilaine *et al.*, 1998). Sendo assim, as informações quanto à localização da proteína RolA na célula vegetal e sua provável função são contraditórias, e, apesar das alterações hormonais detectadas nas plantas *rolA* explicarem parcialmente os fenótipos resultantes, faz-se necessário um aprofundamento das investigações para se chegar a sua verdadeira função biológica.

### Estratégia adotada para estudar a função da proteína RolA em plantas

A capacidade de RolA alterar vários aspectos do crescimento e desenvolvimento de plantas tem atraído a atenção dos cientistas, pois decifrar a função de RolA pode levar ao entendimento de como os fenótipos baixo porte, enrugamento foliar, crescimento deficiente de raízes, retardo na floração e senescência são gerados. Estas informações podem resultar em avanços na Fisiologia Vegetal e Biologia do Desenvolvimento, possibilitando ainda, o controle de características agrônômicas desejáveis em uma determinada cultura.

Tendo como base as hipóteses

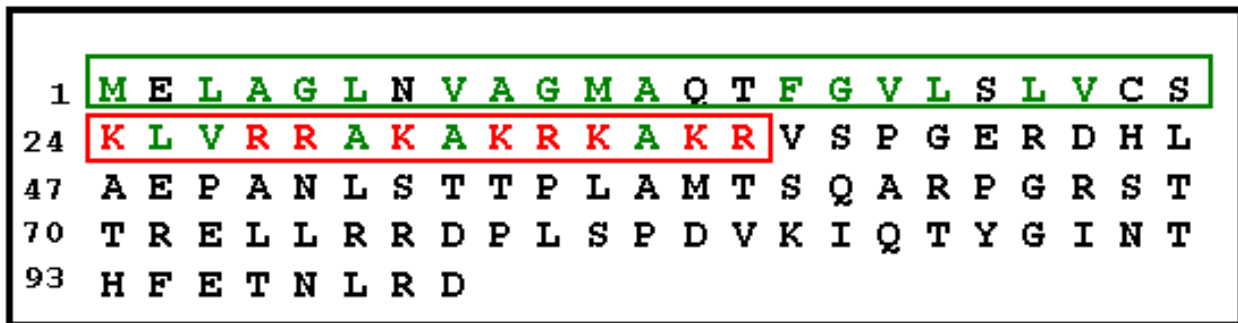
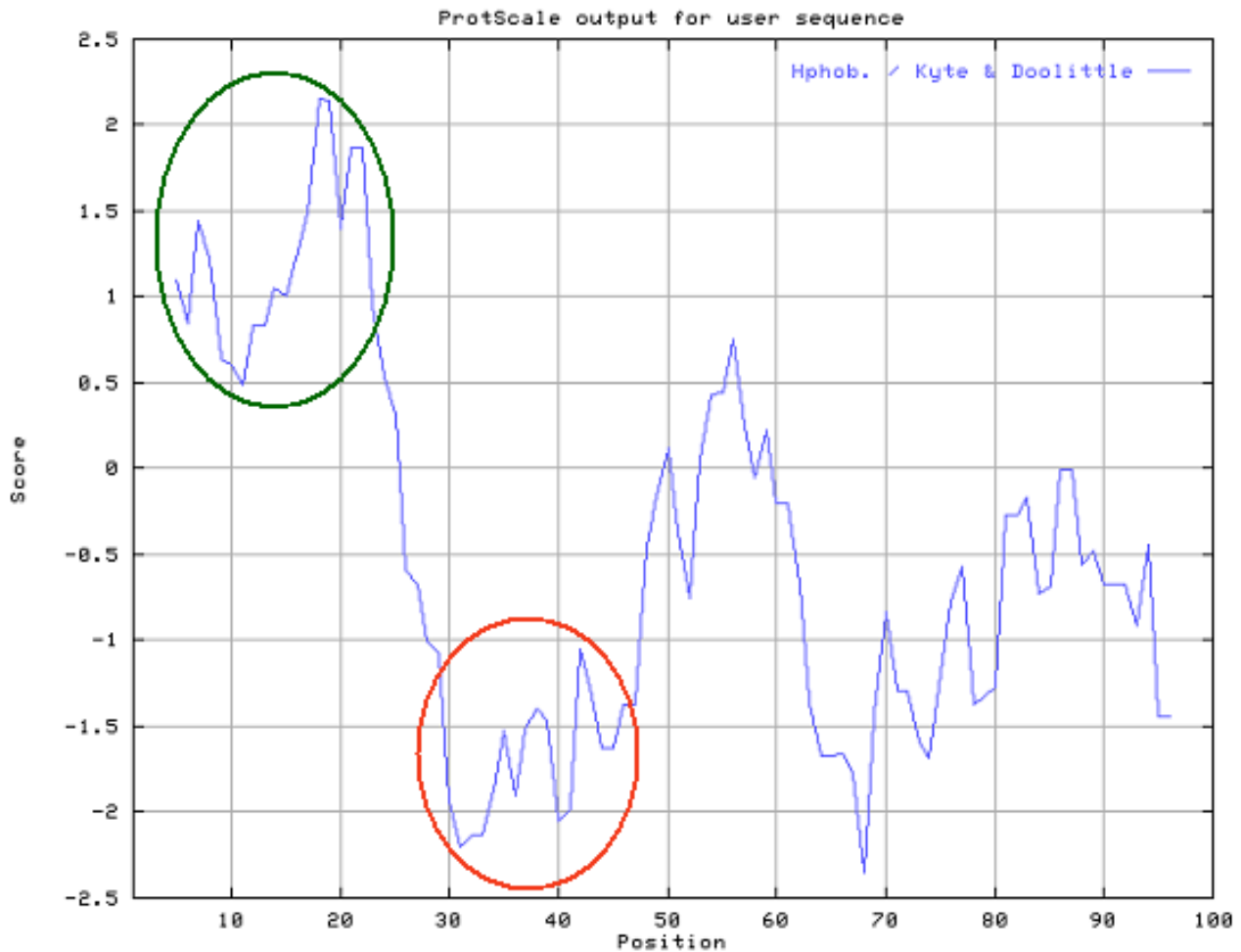
existentes na literatura, de localização da proteína RolA na membrana plasmática ou no núcleo, desenhamos algumas estratégias com o objetivo de testar essas duas hipóteses.

Estudos de modelagem molecular da proteína RolA, realizados por Rigden e Carneiro (1999) culminaram com a proposição de um modelo para a proteína RolA, no qual esta estaria atuando na forma dimérica e interagindo com seqüências de DNA em dois pontos específicos de sua estrutura, os resíduos lisina 24 e arginina 27, via pontes de hidrogênio. Para testar este modelo, experimentos de mutação sítio-dirigida foram realizados, substituindo os aminoácidos lisina 24 e arginina 27 por asparagina 24 e 27 e por glutamina 24 e 27 (Assis, 2003). Asparagina e glutamina foram escolhidos por apresentarem tamanhos similares aos aminoácidos lisina e arginina, mas diferentes quanto às características físico-químicas, o que poderia alterar a especificidade de ligação de RolA com os promotores, sem alterações consideráveis na estrutura da proteína. Os genes *rolA* mutados foram inseridos em plantas de fumo, e análises fenotípicas estão sendo realizadas em nosso laboratório.

Para testar a hipótese de que



**Figura 5.** (A) Planta de *N. tabacum* expressando o gene *rolA* sob controle do seu próprio promotor, à esquerda, e uma planta não transformada, à direita. Ambas possuem a mesma idade. (B) Detalhe da planta expressando o gene *rolA*.



**Figura 6.** Perfil de hidrofobicidade e seqüência primária de RoLA. Destacada em verde, a região hidrofóbica com 22 resíduos de aminoácidos, e em vermelho, uma região hidrofílica de 14 resíduos. As cores representam as propriedades físico-químicas dos resíduos de aminoácidos: verde – apolares, e vermelho – carregados positivamente.

RoLA atue como regulador da expressão de genes, DNA de *Arabidopsis thaliana* foi digerido com enzimas de restrição de corte freqüente, gerando, assim, um banco de fragmentos de DNA. Estes fragmentos foram então incubados com a proteína de fusão GST::RoLA (Santos, 2002) e, concomitantemente, com a proteína GST isolada. A *A. thaliana* foi escolhida como modelo experimental, dado à disponibilidade da seqüência do seu genoma completo em bancos de da-

dos, o que facilita os estudos posteriores. Por análise diferencial, foi possível isolar trinta fragmentos de DNA com os quais RoLA se ligou. Para verificar se esses fragmentos são promotores de genes regulados pela proteína RoLA, eles foram clonados adjacentes à seqüência codante do gene repórter *uidA* (*gus*), que codifica a enzima  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson *et al.*, 1986), em vetores de planta, de forma a tornar possível a verificação da capacidade dos fragmentos de promover a

expressão da Gus. Esses vetores foram então transferidos por eletroporação para protoplastos de fumo, onde foi observada atividade promotora em alguns fragmentos (Barreto *et al.*, 1998). Dois destes fragmentos, quando expressos em plantas de fumo, foram capazes de promover a expressão de Gus nos grãos de pólen de plantas de fumo (Viana, 2003).

Alternativamente, uma outra estratégia foi estabelecida para possibili-

tar a localização subcelular e evidenciar a existência de domínios funcionais na proteína RolA. O perfil de hidrofobicidade da RolA foi determinado, utilizando o programa ProtScale disponível no endereço (<http://www.expasy.ch/>). Duas regiões bem definidas ficaram evidentes no N-terminal da proteína RolA: uma região hidrofóbica seguida de outra hidrofílica (Figura 6). A região hidrofóbica possui 23 resíduos de aminoácidos, dos quais 16 são resíduos apolares (em verde) e a região básica corresponde a 14 resíduos de aminoácidos, sendo que 9 são resíduos básicos (em vermelho) e 5 apolares (em verde) (Figura 6). Em acordo com a hipótese da RolA ser uma proteína reguladora da expressão gênica, foi observado dentro da região básica, uma região homologa ao sinal de endereçamento nuclear da proteína antígeno "large T" do vírus SV40. Por outro lado, os 23 primeiros resíduos de aminoácidos, presentes no N-terminal, essencialmente hidrofóbicos, seguidos de resíduos básicos, hidrofílicos, configuram um possível motivo conhecido como "Reverse-signal-anchor", que, nas bactérias, permitem o ancoramento em membranas (Barros *et al.*, 2003). Os resíduos básicos interagem com as porções hidrofílicas dos lipídeos das membranas promovendo o ancoramento das proteínas na membrana de maneira estável (van Heijne e Manoil, 1990).

Com base nessas informações experimentos foram desenhados para estudar estes motivos putativos encontrados no N-terminal da proteína RolA. Foram construídas fusões tradicionais da proteína RolA inteira, ou apenas segmentos do seu N ou C-terminal, com a enzima repórter Gus (RolA::Gus). Os genes quiméricos foram inseridos no plasmídeo Ti desarmado, sob o controle do promotor CaMV35S. Plantas de fumo transformadas com essas construções foram regeneradas, sendo que o fenótipo característico de plantas *rolA* está presente apenas nas plantas que contêm o gene *rolA* completo. Surpreendentemente, a atividade específica desta proteína de fusão aumentou mais de 50 vezes, devido ao acúmulo da fusão, em torno de 36 vezes maior que a proteína Gus isolada (Barros, 2003). É

possível, que o acúmulo da proteína de fusão observado possa estar relacionado com a função biológica da proteína RolA (Barros *et al.*, 2003). Curiosamente, ensaios preliminares de citoquímica e imunocitoquímica sugerem a presença da proteína RolA::Gus em cloroplastos, em vez de membrana celular ou núcleo, como previsto (Barros, 2003). Desta maneira, é possível que a função da proteína RolA esteja relacionada com esta organela, que tem um papel central no metabolismo vegetal.

### Considerações finais

O conhecimento dos mecanismos moleculares de interação *Agrobacterium*-planta permitiu ao homem manipular geneticamente espécies vegetais, introduzindo genes de interesse agrônomico, resultando em variedades mais produtivas, resistentes a estresses bióticos e abióticos, e com aumento no seu valor nutricional.

Por outro lado, os genes *rol* são ferramentas importantes para o entendimento dos mecanismos de crescimento e desenvolvimento vegetal. Porém, apesar dos esforços de diversos grupos de pesquisa, a função primária de vários desses genes ainda é controversa. Serão necessários, ainda, estudos para se alcançar o completo conhecimento do modo de ação de cada um dos genes *rol* em plantas transgênicas, e seus papéis na interação *Agrobacterium*-planta.

### Bibliografia

Akiyoshi DE, Klee H, Amasino RM, Nester EW, Gordon MP (1984). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 5994-5998.

Altamura MM (2004). *Agrobacterium rhizogenes rolB* and *rolD* genes: regulation and involvement in plant development. *Plant Cell Tiss. Org.*, **77**: 89-101.

Altamura MM, Capitani F, Gazza L, Capone I, Constantino P (1994). The plant oncogene *rolB* stimulates the formation of flower and root

meristemoids in tobacco thin cell layers. *New Phytol.*, **126**: 283-293.

Assis CM (2003). Teste do modelo de interação da proteína RolA de *Agrobacterium rhizogenes* com o DNA em plantas de tabaco. *Dissertação de Mestrado* – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília (UnB).

Baron C & Zambryski C (1996). Plant transformation: A pilus in *Agrobacterium* T-DNA transfer. *Curr. Biol.*, **6**: 1567-1569.

Barreto CC, Rodrigues CA, Carneiro M (1998). Isolamento de promotores de plantas por afinidade pela proteína RolA de *Agrobacterium rhizogenes*. *Comunicado Técnico – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, **29**: 1-5.

Barros LMG (2003). Estudos moleculares da proteína RolA de *Agrobacterium rhizogenes* em plantas de *Nicotiana tabacum*. *Tese de Doutorado* – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília (UnB).

Barros LMG, Curtis RH, Viana AAB, Campos L, Carneiro M (2003). Fused RolA protein enhances b-glucuronidase activity 50-fold: implication for RolA mechanism of action. *Protein Peptide Lett.*, **10** (3): 303-311.

Barry GF, Rogers SG, Fraley RT, Brand L (1984). Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 4776-4780.

Ben-Hayyim G, Martin-Tanguy J, Tepfer D (1996). Changing root and shoot architecture with the *rolA* gene from *Agrobacterium rhizogenes*: Interactions with gibberellic acid and polyamine metabolism. *Physiol. Plantarum*, **96**: 237-243.

Beriam LOS, Malavolta Jr VA, Robbs CF (1996). Considerações sobre o gênero *Agrobacterium*. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, **4**:

- Buchanan RE, Gibbons NE (1975). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8ª edição. Williams & Wilkins Co.
- Buchmann I, Marner FJ, Schröder G, Waffenschmidt S, Schröder J (1985). Tumor genes in plants: T-DNA encoded cytokinin biosynthesis. *EMBO J.*, **4**: 853-859.
- Burtin D, Martin-Tanguy J, Tepfer D (1991). a-DL Difluoromethylornithine, a specific, irreversible inhibitor of putrescine biosynthesis, induces a phenotype in tobacco similar to that ascribed to the root-inducing, left-hand transferred DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Physiol.*, **95**: 461-468.
- Capone I, Spanò L, Cardarelli M, Bellincampi D, Petit A, Constantino P (1989). Induction and growth properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Mol. Biol.*, **13**: 43-52.
- Carneiro M, Vilaine F (1993). Differential expression of the *rolA* plant oncogene and its effect on tobacco development. *Plant J.*, **3**: 785-792.
- Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977). Stable incorporation of Plasmid DNA into higher plant cells: the molecular bases of crown gall tumorigenesis. *Cell*, **11**: 263-271.
- Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempé J (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, **295**: 432-434.
- Christie PJ (1997). *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eu-bacteria. *J. Bacteriol.*, **179**: 3085-3094.
- Conn HJ (1942). Validity of the genus *Alcaligenes*. *J. Bacteriol.*, **44**: 353-360.
- De Block M, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Schell J, Zambryski P (1984). Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *EMBO J.*, **3**: 1681-1690.
- De Cleene M, De Ley J (1976). The host range of crown gall. *Bot. Rev.*, **42**: 389-466.
- De Greve H, Dhaese P, Seurinck J, Lemmers M, Van Montagu M, Schell J (1982). Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene. *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**: 499-511.
- Dehio C, Grossmann K, Schell J, Schmülling T (1993). Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Mol. Biol.*, **23**: 1199-1210.
- Dessaux Y, Petit A, Farrand SK, Murphy PJ (1998). Opines and opine-like molecules involved in plant-*Rhizobiaceae* interactions, p. 173-197. In Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (ed.). *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Douglas CJ, Walter H, Nester EW (1982). *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachment to plants. *J. Bacteriol.*, **152**: 1265-1275.
- Eklöf S, Åstot C, Moritz T, Blackwell J, Olsson O, Sandberg G (1996). Cytokinin metabolites and gradients in wild type and transgenic tobacco with moderate cytokinin over-production. *Physiol. Plantarum*, **98**: 333-344.
- Estruch JJ, Chriqui D, Grossmann K, Schell J, Spena A (1991a) The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. *EMBO J.*, **10**: 2889-2895
- Estruch JJ, Schell J, Spena A (1991b). The protein encoded by the *rolB* plant oncogene hydrolyses indole glucosides. *EMBO J.*, **10**: 3125-3128
- Filippini F, Lo Schiavo F, Terzi M, Costantino P, Trovato M (1994). The plant oncogene *rolB* alters binding of auxin to plant cell membranes. *Plant Cell Physiol.*, **35**: 767-771.
- Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, White FF, Gordon MP, Nester EW, (1981). Genetic analysis of crown gall: Fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell*, **27**: 143-153.
- Gelvin SB (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Phys.*, **51**: 223-256.
- Hansen G, Larribe M, Vaubert D, Tempé J, Biermann BJ, Montoya AL, Chilton MD, Brevet J (1991). *Agrobacterium rhizogenes*, pRi8196 T-DNA: Mapping and DNA sequence of functions involved in mannopine synthesis and hairy root differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 7763-7767.
- Hansen G, Vaubert D, Clérot D, Tempé J, Brevet J (1994). A new open reading frame, encoding a putative regulatory protein, in *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *CR Acad Sci*, **317**: 49-53.
- Herrera-Estrella A, Chen Z, Van Montagu M, Wang K (1988). VirD proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are required for the formation of a covalent DNA protein complex at the 5' terminus of the T-strand molecules. *EMBO J.*, **7**: 4055-4062.
- Hildebrand EM (1934). Life history of

- the hairy-root organism in relation to its pathogenesis on nursery apple trees. *J. Agr. Sci.*, **48**: 857-885.
- Holsters M, Silva B, Van Vliet F, Genetello C, De Block M, Dhaese P, Depicker A, Inzé D, Engler G, Villarroel R, Van Montagu M, Schell J (1980). The functional organization of the nopaline *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid*, **3**: 212-230.
- Hong SB, Hwang I, Dessaux Y, Guyon P, Kim KS, Farrand SK (1997). A T-DNA gene required for agropine biosynthesis by transformed plants is functionally and evolutionarily related to a Ti plasmid gene required for catabolism of agropine by *Agrobacterium* strains. *J. Bacteriol.*, **179**: 4831-4840.
- Hooykaas PJJ, den Dulk-Ras H, Schilperoort RA (1988). The *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene 6b is an onc gene. *Plant Mol. Biol.*, **11**: 791-794.
- Horsch RB, Fraley RT, Rogers SG, Sanders PR, Lloyd A, Hoffmann M (1984). Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, **223**: 496-498.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, **227**: 1229-1231.
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986). b-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 8447-8451.
- Jouanin L (1984). Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids. *Plasmid*, **12**: 91-102.
- Joubert P, Beaupère D, Lelièvre P, Wadouachi A, Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS (2002). Effects of phenolic compounds on *Agrobacterium virgenes* and gene transfer induction – a plausible molecular mechanism of phenol binding protein activation. *Plant Sci.*, **162**: 733-743.
- Kerr A (1969a). Crown gall on stone fruit. I Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* and related species. *Aust. J. Biol. Sci.*, **22**: 111-116.
- Kerr A (1969b). Transfer of virulence between isolates of *Agrobacterium*. *Nature*, **223**: 1175-1176.
- Körber H, Strizhov N, Staiger D, Feldwisch J, Olsson O, Sandberg G, Palme K, Schell J, Koncz C (1991). T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants. *EMBO J.*, **10**: 3983-3991.
- Levesque H, Delepelaire P, Rouze P, Slightom J, Tepfer D (1988). Common evolutionary origin of the central portions of the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and the Ti T-DNAs of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant. Mol. Biol.*, **11**, 731-744.
- Matthysse AG, Homes KV, Gurlitz RH, (1981). Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J. Bacteriol.*, **145**: 583-595.
- Maurel C, Barbier-Brygoo H, Spena A, Tempe J, Guem J (1991). Single rol genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA alter some of the cellular responses to auxin in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.*, **97**: 212-216.
- Mauro ML, Trovato M, De Palois A, Gallelli A, Constantino P, Altamura MM (1996) The plant oncogene *rolD* stimulates flowering in transgenic tobacco plants. *Dev. Biol.*, **180**: 693-700
- Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Nawrath C, Bakkeren G, Cramer A, Angelis K, Redei GP, Schell J, Hohn B, Koncz (1991). T-DNA integration: a model of illegitimate recombination in plants. *EMBO J.*, **10**: 697-704.
- Messens F, Lenaerts A, Van Montagu M, Hedges RW (1985). Genetic basis for opine secretion from crown gall tumor cells. *Mol. Gen. Genet.*, **199**: 344-348.
- Moore J, Warren G, Strobel G (1979). Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid*, **2**: 617-626.
- Moritz T, Schmülling (1998) The Gibberellin content of *rolA* transgenic tobacco plants is specifically altered. *J. Plant Physiol.*, **153**: 774-776.
- Moriuchi H, Okamoto C, Nishihama R, Yamashita I, Machida Y, Tanaka N (2004). Nuclear localization and interaction of RolB with plant 14-3-3 proteins correlates with induction of adventitious roots by the oncogene *rolB*. *Plant J.*, **38**: 260-275.
- Nilsson O, Moritz T, Imbault N, Sundberg G, Olsson O (1993). Hormonal characterization of transgenic tobacco plants expressing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA. *Plant Physiol.*, **102**: 363-371.
- Nilsson O, Moritz T, Sundberg B, Sundberg G, Olsson O (1996). Expression of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene in a deciduous forest tree alters growth and development and leads to stem fasciation. *Plant Physiol.*, **112**: 493-502.
- Nilsson O, Olsson O (1997). Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiol. Plantarum*, **100**: 463-473.
- Odell JT, Nagy F, Chua N-H (1985). Identification of DNA sequences required for the activity of the

- cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, **313**: 810-812.
- Ooms G, Hooykaas PJJ, Moolenaar G, Schilperoort RA (1981). Crown gall tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids: Analysis of T-DNA functions. *Gene*, **14**: 33-50.
- Ooms G, Hooykaas PJJ, Van Veen RJM, Van Beelen P, Regensburg-Tuink TJG, Schilperoort RA (1982). Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid*, **7**: 15-29.
- Oono Y, Handa T, Kanaya K, Uchimiya H (1987). TL-DNA gene of Ri plasmids responsible for dwarfness of tobacco plants. *Jpn. J. Genet.*, **62**: 501-505.
- Petit A, David C, Dahl GA, Ellis JG, Guyon P, CasseDelbart F, Tempé J (1983). Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.*, **190**: 204-214.
- Petit A, Delhaye S, Tempé J, Morel G (1970). Recherches sur les guanidines des tissus de crown-gall. Mise en évidence d'une relation biochimique spécifique entre les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et les tumeurs qu'elles induisent. *Physiol. Veg.*, **8**: 205-213.
- Porter, JR (1991). Host range and implication of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. – *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, **10**: 387-421.
- Riker AJ, Banfield WM, Wright WH, Keitt GW, Sagen HE (1930). Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *J. Agr. Res.*, **41**: 507-540.
- Rigden DJ, Carneiro M (1999) A structural model for the RolA protein and its interaction with DNA. *Proteins*, **37**: 697-708.
- Romano C, Hein M, Klee HJ (1991). Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthase gene of *Pseudomonas savastanoi*. *Genes Dev.*, **5**: 438-446.
- Romeiro RS, Barbosa JG, Oliveira JR, Napoleão RL (1994). Galha da roseira (*Agrobacterium tumefaciens*) na microrregião de Barbacena (Minas Gerais, Brasil) e suas implicações fitopatológicas e econômicas. *Fitopatologia Brasileira*, **19** (suplemento): 320.
- Santos MMB (2002). Expressão do gene rolA de *Agrobacterium rhizogenes* em bactéria e produção de anticorpos anti-RolA. *Dissertação de Mestrado* – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília (UnB).
- Schell J, Van Montagu M, De Beuckeleer M, De Block M, Depicker A, De Wilde M, Engler G, Genetello C, Hernalsteens JP, Holsters M, Seurinck J, Silva B, Van Vliet F, Villaroel R (1979). Interaction and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.*, **204**: 251-266.
- Schmülling T, Schell J, Spena A (1988). Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO J.*, **7** (9): 2621-2629.
- Schmülling T, Schell J, Spena A (1989) Promoters of the rolA, B and C genes of *Agrobacterium rhizogenes* are differentially regulated in transgenic plants. *Plant Cell*, **1**: 665-670.
- Schmülling T, Fladung M, Grossmann K, Schell J (1993). Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single rol genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant J.*, **3**: 371-382.
- Schröder G, Waffenschmidt S, Weiler EW, Schröder J (1984). The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.*, **138**: 387-391.
- Sinkar VP, Pythoud F, White FF, Nester EW, Gordon MP (1988). rolA locus of the Ri plasmid directs developmental abnormalities in transgenic tobacco plants. *Genes Dev.*, **2**: 688-697.
- Slightom JL, Durand-Tardif M, Jouanin L, Tepfer D (1986). Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. *J. Biol. Chem.*, **261**: 108-121.
- Smith EF; Townsend CO (1907). A plant-tumor of bacterial origin. *Science*, **25**: 671-673.
- Spena A, Schmülling T, Konec C, Schell JS (1987) Independent and synergistic activity of rolA, Band C loci in stimulating abnormal growth in plants. *EMBO J.*, **6**: 3891-3899.
- Stachel SE, Timmerman B, Zambryski P (1986) Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature*, **322**: 706-712.
- Stachel SE, Zambryski PC (1986). virA and virG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. *Cell*, **46**: 325-333.
- Sun JY, Monneuse MO, Martin-Tanguy J, Tepfer D (1991). Changes in flowering and the accumulation of polyamines and hydroxycinnamic acid-polyamine conjugates in tobacco plants transformed by the rolA locus from the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Sci.*, **80**: 145-156.
- Tepfer D (1984). Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual

- transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, **37**: 959-967.
- Thomashow MF, Nutter R, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1980). Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell*, **19**: 729-739.
- Thomashow LS, Reeves S, Thomashow MF (1984). Crown gall oncogenesis: Evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyses synthesis of indoleacetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 5071-5075.
- Thomashow MF, Hughly S, Buchholtz WG, Thomashow LS (1986). Molecular basis for the auxin-independent phenotype of crown gall tumor tissue. *Science*, **231**: 616-618.
- Tinland B, Fournier P, Heckel T, Otten L (1992). Expression of a chimaeric *h e a t - s h o c k - i n d u c i b l e* *Agrobacterium* 6b oncogene in *Nicotiana rustica*. *Plant Mol. Biol.*, **18**: 921-930.
- Trovato M, Maras B, Linhares F, Costantino P (2001). The plant oncogene *rolD* encodes a functional ornithine cyclodeaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 13449-13453.
- Tzfira T, Rhee Y, Chem MH, Kunik T, Citovsky V (2000). Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**: 187-219.
- Van Heijne G, Manoil C (1990). Membrane proteins: from sequence to structure. *Protein Eng.*, **4**: 109-112.
- Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, van den Elsack D, Zaenen I, Schilperoort RA; Schell J (1974). Large Plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown-gall inducing activity. *Nature*, **255**: 742-743
- Van Onckelen H, Prinsen E, Inés d, Rüdelsheim P, van Lijsebettens M, Follin A, Schell J, van Montagu M, De Greef J (1986). *Agrobacterium* T-DNA gene 1 codes for tryptophan 2-monooxygenase activity in tobacco crown gall cells. *FEBS Lett.*, **198**: 357-360.
- Vansuyt G, Vilaine F, Tepfer M, Rossignol M (1992). *rolA* modulates the sensitivity to auxin of the proton translocation catalyzed by the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in transformed tobacco. *FEBS Lett*, **298**: 89-92.
- Viana AAB (2003). Sequências com afinidade pela proteína RolA de *Agrobacterium rhizogenes* promovem expressão pólen-específica em plantas de tabaco. *Dissertação de Mestrado* – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília (UnB).
- Vilaine F, Rembur J, Chriqui D, Tepfer (1998). M. Modified Development in transgenic tobacco plants expressing a *rolA::GUS* translational fusion and subcellular localization of the fusion protein. *Mol. Plant Microbe In.*, **11** (9), 855-859.
- Walden R, Czaja I, Schmülling T, Schell J (1993). *rol* genes alter hormonal requirements for protoplast growth and modify the expression of an auxin responsive promoter. *Plant Cell Rep.*, **12**: 551-554.
- Wang K, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Zambrisky P (1984). Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell*, **38**: 455-462.
- Wang K, Stachel SE, Timmerman B, Van Montagu M, Zambrisky P (1987). Site-specific nick occurs within the 25 bp transfer promoting border sequence following induction of vir gene expression in of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science*, **235**: 587-591.
- White PR, Braun AC (1943). Crown gall production by bacteria-free tumor tissues. *Science*, **94**: 239-241.
- White FF, Ghidossi G, Gordon MP, Nester EW (1982). Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 3193-3197.
- White FF, Taylor BH, Huffman GA, Gordon MP, Nester EW (1985). Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.*, **164**: 33-44.
- Willmitzer L, Schmalenbach W, Schell J (1981). Transcription of T-DNA in octopine and nopaline crown gall tumours is inhibited by low concentration of á-amanitin. *Nucleic Acids Res.*, **9**: 4801-4812.
- Winans SC, Kerstetter RA, Ward JE, Nester EW (1989). A protein required for transcriptional regulation o *Agrobacterium* virulence genes spans the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.*, **171**: 1616-1622.
- Yanofsky MF, Porter SG, Young C, Albright LM, Gordon MP, Nester EW (1986). The *virD* operon of *agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell*, **7**: 471-477.
- Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJJ, Farrand SK, Winans SC (2000). The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.*, **182**: 3885-3895.
- Zupan JR, Citovsky V, Zambryski P (1996). *Agrobacterium* Vir E2 protein mediates nuclear uptake of single-stranded DNA in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 2392-2397.

