

Indução de culturas de raízes por diferentes linhagens de *Agrobacterium rhizogenes* em plântulas de *Cichorium intybus*, *Daucus carota*, *Macroptilium atropurpureum* e *Plantago* sp



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Milho e Sorgo  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
197**

Indução de Culturas de Raízes por Diferentes  
Linhagens de *Agrobacterium rhizogenes* em  
Plântulas de *Cichorium intybus*, *Daucus carota*,  
*Macroptilium atropurpureum* e *Plantago* sp

Andréa Almeida Carneiro  
Gleyce Aparecida dos Santos Moreira  
Karinne Miranda Rodrigues Medeiros  
Rayanne Pereira de Oliveira  
Caroline Fonseca Ferreira  
Francisco Adriano de Souza

**Esta publicação está disponível no endereço:**  
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

**Embrapa Milho e Sorgo**  
Rod. MG 424 Km 45  
Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
Fone: (31) 3027-1100  
Fax: (31) 3027-1188  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente  
*Maria Marta Pastina*

Secretário-Executivo  
*Elena Charlotte Landau*

Membros  
*Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria  
Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira  
Simeone, Roberto dos Santos Trindade e  
Rosângela Lacerda de Castro*

Revisão de texto  
*Antonio Claudio da Silva Barros*

Normalização bibliográfica  
*Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)*

Tratamento das ilustrações  
*Mônica Aparecida de Castro*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Mônica Aparecida de Castro*

Foto da capa  
*Andréa Almeida Carneiro*

**1ª edição**  
*Publicação digitalizada (2019)*

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Nome da unidade catalogadora

---

Indução de culturas de raízes por diferentes linhagens de *Agrobacterium rhizogenes* em  
plântulas de *Cichorium intybus*, *Daucus carota*, *Macroptilium atropurpureum* e  
*Plantago* sp / Andréa Almeida Carneiro ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e  
Sorgo, 2019.

26 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN  
1679-0154; 197).

1. Biotecnologia. 2. Cultura de tecido. 3. Raiz. 4. Cultivo de órgãos radiculares. I.  
Carneiro, Andréa Almeida. II. Moreira, Gleyce Aparecida dos Santos. III. Medeiros, Karine  
Miranda Rodrigues. IV. Oliveira, Rayanne Pereira de. V. Ferreira, Caroline Fonseca. VI.  
Souza, Francisco Adriano de. VII. Série.

CDD 631.5233 (21. ed.)

*Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)*

© Embrapa, 2019

## Sumário

---

Resumo .....	05
Abstract .....	07
Introdução.....	07
Material e Métodos .....	13
Resultados e Discussão .....	15
Conclusões.....	20
Referências .....	21

# Indução de Culturas de Raízes por Diferentes Linhagens de *Agrobacterium rhizogenes* em Plântulas de *Cichorium intybus*, *Daucus carota*, *Macroptilium atropurpureum* e *Plantago* sp

Andréa Almeida Carneiro<sup>1</sup>

Gleyce Aparecida dos Santos Moreira<sup>2</sup>

Karinne Miranda Rodrigues Medeiros<sup>3</sup>

Rayanne Pereira de Oliveira<sup>4</sup>

Caroline Fonseca Ferreira<sup>5</sup>

Francisco Adriano de Souza<sup>6</sup>

**Resumo** – O cultivo de raízes de plantas na ausência de parte aérea, também conhecido, como cultura de órgãos radiculares (COR), tem inúmeras aplicações biotecnológicas. Estas aplicações vão desde a produção de compostos bioativos e fármacos até cultivo de microrganismos. Sistemas baseados em COR são especialmente indicados para a produção de compostos exclusivamente sintetizados em raízes de plantas. Esse sistema permite o crescimento de raízes em condições assépticas, em biorreatores, facilitando assim sua aplicação industrial. A principal forma de se obter COR é através da transformação via infecção de células vegetais com *Agrobacterium rhizogenes* contendo o plasmídeo Ri T-DNA que causa a doença denominada raízes em cabeleira. A eficiência do processo de transformação depende da virulência da cepa de *A. rhizogenes* em relação a espécie vegetal. O objetivo deste trabalho é testar e desenvolver protocolos de transformação através da seleção de cepas de *A. rhizogenes* (R1601, 2659, 8196 e A4) eficientes para obtenção de COR de almeirão (*Cichorium intybus*), cenoura (*Daucus carota*), siratro (*Macroptilium atropurpureum*) e tanchagem (*Plantago* sp.). Foi

---

<sup>1</sup> Bióloga PhD, Pesquisadora Embrapa Milho e Sorgo

<sup>2</sup> Eng.Ambiental, Bolsista Embrapa Milho e Sorgo

<sup>3</sup> Docente Ciências Biológicas, UNIFFEN, estagiária Embrapa Milho e Sorgo

<sup>4</sup> Bióloga Mestre, Bolsista Embrapa Milho e Sorgo

<sup>5</sup> Bióloga, Estagiária Embrapa Milho e Sorgo

<sup>6</sup> Eng. Agrôn. PhD, Pesquisador Embrapa Milho e Sorgo

possível desenvolver protocolos e selecionar linhagens clonais de COR de todas as espécies vegetais testadas. Para cada espécie vegetal a eficiência do processo de transformação variou com a cepa de *A. rhizogenes* e com o tipo de tecido utilizado. Até onde sabemos, os protocolos para transformação com Ri T-DNA para siratro foram relatados aqui pela primeira vez, bem com a transformação de cenoura e tanchagem utilizando folhas ao invés de tecido cambial e raízes, respectivamente. do processo de transformação variou com a cepa de *A. rhizogenes* e com o tipo de tecido utilizado. Até onde sabemos, os protocolos para transformação com Ri T-DNA para siratro foram relatados aqui pela primeira vez, bem com a transformação de cenoura e tanchagem utilizando folhas ao invés de tecido cambial e raízes, respectivamente.

**Termos para indexação:** cultivo de órgãos radiculares, transformação de plantas, raízes em cabeleira, cultura de tecidos, biotecnologia, Ri T-DNA.

## Hairy root induction by different *Agrobacterium rhizogenes* in Seedlings of *Cichorium intybus*, *Daucus carota*, *Macroptilium atropurpureum* and *Plantago* sp

Plant root cultivation in the absence of shoots, also known as root organ culture (ROC), has numerous biotechnological applications. These applications range from the production of bioactive and pharmaceutical compounds to microorganisms. ROC-based systems are especially suited for the production of compounds exclusively synthesized in plant roots. This system allows root growth under aseptic conditions in bioreactors, thus facilitating its industrial application. The main way to obtain ROC is by transformation via plant cell infection with *Agrobacterium rhizogenes* containing the plasmid Ri T-DNA. The efficiency of the transformation process depends on the virulence of *A. rhizogenes* strain in relation to plant species. The objective of this study was to select among the strains of *A. rhizogenes* R1601, 2659, 8196 and A4, the most efficient to obtain ROC from chicory (*Cichorium intybus*), carrot (*Daucus carota*), siratro (*Macroptilium atropurpureum*) and plantain (*Plantago* sp.). It was possible to obtain ROC from all plant species tested. For each plant species the efficiency of the transformation process varied with *A. rhizogenes* strain and the type of tissue used. To our knowledge, the protocols for Ri T DNA transformation of plantain and siratro are reported here for the first time.

**Index terms: root organ culture, plant transformation, hairy roots, tissue culture, biotechnology, Ri T-DNA.**

---

## Introdução

---

Plantas de diferentes gêneros e famílias são suscetíveis a infecção por *Agrobacterium rhizogenes* (atualmente renomeada *Rhizobium rhizogenes*), uma bactéria de solo Gram negativa (Bahramnejad et al., 2019). Essa bactéria é o agente causal da doença em plantas conhecida como “hairy roots” ou raízes em cabeleira, que é caracterizada por uma rápida proliferação de raízes adventícias no local da infecção. *A. rhizogenes* induz a formação dessas raízes em razão da presença em suas células de um plasmídeo virulento, cópia única, conhecido como Ri ou indutor de raiz (Chilton et al., 1982). Este é um processo que ocorre normalmente na natureza, portanto as culturas de raízes geradas com *A. rhizogenes* selvagens não são consideradas um produto geneticamente modificado.

Linhagens de raízes Ri T-DNA apresentam altas taxa de crescimento e grande estabilidade genotípica ao longo do tempo. Essas raízes podem ser cultivadas em biorreatores apresentando diversas aplicações biotecnológicas (Giri; Narasu, 2000). Dentre estas se destacam a produção de fármacos e a produção de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares (Bécard; Fortim, 1988; Souza; Barbara, 1999; Douds, 2002; Gai et al., 2015; Mehrotra et al., 2015; Rachamalla, 2016; Guimarães et al., 2017; John et al., 2017; Sharma et al., 2017; Panda et al., 2017).

O controle genético em *A. rhizogenes* Ri T-DNA é semelhante ao do plasmídeo Ti da *A. tumefaciens*. O plasmídeo Ri contém um segmento de DNA que é transferido para o genoma da planta durante a infecção (T-DNA) e uma região com genes responsáveis pela transferência do T-DNA conhecida como região de virulência (*vir*) (Chilton et al., 1982; White et al., 1982). Uma cópia do T-DNA é transferida para as células vegetais e torna-se estavelmente integrada no genoma do hospedeiro (Chilton et al., 1982). Genes codificados pelo T-DNA são de origem bacteriana, mas possuem sequências regulatórias eucarióticas permitindo sua expressão em células de plantas. Nas cepas de *A. rhizogenes* que contêm o plasmídeo Ri do tipo agropino, o T-DNA é dividido em T-DNA esquerdo ou “left” (TL-DNA) e T-DNA direito ou “right” (TR-DNA). Os dois T-DNAs são separados um do outro por aproximadamente 15 kb de DNA não transferido.



O TR T-DNA contém genes homólogos aos genes de indução de tumor (isto é, síntese de auxina *tms1* e *tms2*) do plasmídeo Ti de *A. tumefaciens* (Huffman et al., 1984; Jouanin, 1984) e genes envolvidos na biossíntese de agropino (*ags*) (Huffman et al., 1984). Mutagênese desta região do plasmídeo Ri resulta na perda ou atenuação da virulência (White et al., 1985).

Ao contrário do TR-DNA, o TL-DNA parece não ter nenhuma relação com o plasmídeo Ti de *A. tumefaciens* (Huffman et al., 1984). Genes presentes no TL-DNA direcionam a síntese de substâncias responsáveis pela diferenciação das células em raízes, os genes *rol* (root locus) (Shen et al., 1988). A função dos genes *rol* (root locus), *rolA*, *rolB*, *rolC* e *rolD* foi elucidada por White et al. (1985) utilizando mutagênese via transposons. Estes pesquisadores mostraram que a expressão individual dos genes *rolA*, *rolB*, e *rolC* (ORF 10, 11 e 12 do TL T-DNA) ou em combinação é importante para a formação das raízes adventícias em tabaco.

Células vegetais com o T-DNA integrado no genoma são capazes de produzir opinos. Opinos são compostos formados por carbono e nitrogênio, utilizados como fonte de energia pela *Agrobacterium* infectante. Os isolados de *A. rhizogenes* são classificados de acordo com os tipos de opinos que produzem, sendo os mais comuns agropino, mannopino e cucumopino. Estirpes produtoras de agopinas, tais como R1601, A4, HRI e LBA9402 são mais eficientes na transformação de uma grande variedade de espécies de plantas e seu plasmídeo Ri contem o TL e TR-DNA (Jouanin, 1984; Huffman et al., 1984).

Genes de virulência presentes na região *vir* do plasmídeo Ri e alguns genes encontrados nos cromossomos bacterianos (isto é, *chv*) atuam na transferência do T-DNA (Gelvin, 2000) da bactéria para a célula vegetal.

O processo infeccioso de plantas por cepas selvagens de *A. rhizogenes* é caracterizado por quatro etapas distintas: 1) o movimento da *Agrobacterium* em direção às células da planta; 2) ligação das bactérias na superfície da parede celular; 3) ativação dos genes de virulência (*vir*); e 4) transferência e integração do T-DNA no genoma da planta (Zupan; Zambryski, 1997).

As condições de infecção e a escolha da cepa de *Agrobacterium* são parâmetros primordiais, uma vez que algumas plantas são muito resistentes à infecção (Gai et al., 2015; Mehrotra et al., 2015; Rachamalla, 2016; Guimarães

et al., 2017; John et al., 2017; Panda et al., 2017), as monocotiledôneas, por exemplo, são mais difíceis de serem transformadas via *Agrobacterium* do que as dicotiledôneas. Além disso, diferentes cepas de *A. rhizogenes* variam na capacidade de transformação (Giri et al., 1997; Ionkova; Fuss, 2009) de diferentes espécies de plantas. Por exemplo, quando as cepas A4RS, ARqua1, 1724, 2659, 8196 foram utilizadas para infectar plantas de café, a eficiência de transformação foi superior a 75% para a cepa A4RS e 0% para a cepa 8196 (Alpizar et al., 2006).

A concentração bacteriana desempenha um papel importante para a produção de raízes adventícias transformadas. Concentrações abaixo do ideal podem resultar em menor disponibilidade de bactérias para transformar as células vegetais, enquanto concentrações elevadas podem diminuir a eficiência de transformação por causa da inibição competitiva (Park; Facchini, 2000). A concentração bacteriana utilizada na maioria dos trabalhos revisados está na faixa entre D.O.<sup>550</sup> = 0,3 a 1,0 (Alpizar et al., 2006; Frame et al., 2006; Ionkova; Fuss, 2009; Ho-Plágaro et al., 2018) que corresponde a 10<sup>9</sup> células / ml.

Na transformação de plantas por *A. rhizogenes*, vários protocolos têm sido utilizados para a infecção do material vegetal por *A. rhizogenes*. No entanto, o sucesso da transformação depende de vários parâmetros, tais como a espécie e idade do tecido vegetal, sendo que, em geral, os tecidos mais jovens são mais sensíveis à infecção pela *Agrobacterium* (Sevón; Oksman-Caldentey, 2002). Os materiais vegetais mais utilizados para a infecção são embriões imaturos, calos embriogênicos, segmentos de hipocótilo, cotilédones, pecíolos e folhas jovens (Frame et al., 2006; Xu et al., 2006; Ionkova; Fuss, 2009).

O contato entre bactérias e células de plantas pode ser realizado por injeção direta de suspensão bacteriana na plântula ou por imersão dos tecidos da planta na suspensão bacteriana. Com plantas recalcitrantes à transformação, procedimentos alternativos podem ser implementados. Entre esses procedimentos, a eletroporação (Matsuki et al., 1989) ou a sonicação (SAAT/ Sonication Assisted *Agrobacterium* mediated Transformation) têm sido utilizadas com resultados satisfatórios (Le Flem Bonhomme et al., 2004).

A transcrição da região *vir*, durante a transformação, é induzida por diversos compostos fenólicos, tais como acetoseringona e  $\alpha$ -hidroxi-acetoseringona,

liberados quando células vegetais são feridas. Suplementação de meios de cultivo com acetoseringona (50 a 150  $\mu\text{M}$ ) ou compostos relacionados têm sido utilizados para aumentar a frequência de transformação via *Agrobacterium* em várias espécies de plantas (Kumar et al., 2006; Ionkova; Fuss, 2009). Além disso, vários monossacarídeos (isto é, glicose) agem sinergisticamente com acetoseringona para induzir um nível elevado de expressão do gene *vir* (Frame et al., 2006).

A duração do contato planta/bactéria durante a infecção e o cocultivo são parâmetros que devem ser otimizados. A duração média de cocultivo é de cerca de dois ou três dias, entretanto Bosselut et al. (2011) e Alpizar et al. (2008) relataram que 5 e 14 dias de cocultivo dos explantes de *Prunus* e de *Coffea arabica* com *A. rhizogenes*, respectivamente, renderam a maior eficiência de transformação. Depois do cocultivo, os explantes devem ser transferidos para um meio sólido contendo um antibiótico para eliminar as bactérias, como cefotaxima (250-500 mg L<sup>-1</sup>) e/ou Timentin (200-300 mg L<sup>-1</sup>) (Danesh et al., 2006; Fons et al., 1999).

Outro fator impactante na transformação genética de plantas via *Agrobacterium* é a temperatura do cocultivo da bactéria com os explantes vegetais. Durante o cocultivo uma cópia do T-DNA é produzida e transferida para a célula vegetal. Para tanto, os genes da região *vir* do plasmídeo Ti ou Ri devem estar ativados. No caso de *A. tumefaciens*, tem sido proposto que a ativação dos genes *vir* é dependente da temperatura, sendo que a faixa de temperatura ótima está entre 19 e 20 °C (Boisson-Dernier et al., 2001). Na transformação de *M. truncatula* com *A. rhizogenes*, a porcentagem de plantas transgênicas foi significativamente maior quando o cocultivo foi realizado a 20 °C (63  $\pm$  8%) do que a 25 °C (33  $\pm$  11%) (Boisson-Dernier et al., 2001). Do mesmo modo, Dillen et al. (1997) demonstraram uma expressão transiente ótima do gene repórter quando o cocultivo com *A. tumefaciens* foi realizado entre 19-22 °C.

Após o cocultivo, os explantes são transferidos para um meio sólido livre de hormônio, no escuro a 20-25 °C, e as primeiras raízes aparecem após 1-4 semanas (Xu et al., 2006).

Diferentes meios de cultura já foram utilizados para crescer raízes transformadas com o T-DNA dos plasmídeos Ri, sendo os mais comumente

utilizados, o meio Murashige and Skoog (MS) e o meio de White original ou modificado (Bécard; Fortin, 1988).

Apesar de as raízes adventícias geradas após a infecção com *A. rhizogenes* variarem em morfologia, elas compartilham algumas características comuns, tais como presença de numerosas ramificações laterais e crescimento plagiotrópico na ausência de fitormônios. Além disso, essas raízes também são caracterizadas pela sua elevada estabilidade genética (Shanks; Morgan, 1999).

A eficiência da transformação pode ser verificada através de testes que confirmem a integração T-DNA. Neste sentido, os procedimentos mais utilizados são PCR e o *Southern blotting* para detectar os genes *rol* utilizados (Lorence et al., 2004; Tiwari et al., 2007). PCR adicionais e Southern blotting do gene *vir D* às vezes são realizados para verificar a eliminação total da *Agrobacterium* (Shi et al., 2006), bem como pela detecção da síntese de agropinas nos tecidos transformados (Bécard; Fortin, 1988).

O desenvolvimento de protocolos eficientes para espécies de plantas distintas requer: 1) seleção de estirpes eficientes; 2) ajuste dos parâmetros da infecção e meios para transformação; 3) seleção e desinfestação do tecido vegetal a ser utilizado; 4) método de inoculação da bactéria; 5) concentração de acetoceringone, dentre outros fatores. Para cenoura, os protocolos são ajustados para transformação a partir de raízes tuberosas. Esse tecido requer a obtenção de raízes de plantas adultas e é mais difícil de ser desinfestado. Já para as espécies siratro, não existem protocolos publicados, segundo busca realizada na base Web of Science (11/2019), e para tanchagem, foi encontrado um artigo que traz um protocolo baseado na transformação a partir de tecidos radiculares (Fons et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi testar e desenvolver protocolos simples, rápidos e eficientes de indução de raízes de almeirão, cenoura, siratro e tanchagem utilizando *A. rhizogenes* a partir da infecção de tecidos jovens obtidos de plântulas em sistema asséptico. O aprimoramento de métodos de transformação por *A. rhizogenes* e a seleção de cepas mais indicadas para cada espécie vegetal são de fundamental importância, tanto para o sucesso do processo como para a redução do tempo e aumento da eficiência em termos de número de transformantes. Neste sentido, as espécies de plantas foram escolhidas, neste estudo, por pertencerem a famílias distintas

e, assim, possibilitarem uma melhor avaliação do potencial das estirpes quanto a virulência e também quanto ao desenvolvimento do protocolo de transformação.

## Material e Métodos

---

### Estirpes selvagens de *Agrobacterium rhizogenes*

Quatro cepas de *A. rhizogenes* (R1601, 2659, 8196 e A4), pertencentes à coleção de microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo, foram comparadas quanto a sua eficiência de transformação de almeirão, cenoura, siratro e tanchagem.

### Material vegetal

Sementes de cultivares de cenoura Planalto (*Daucus carota*), almeirão Folha Larga (*Cichorium intybus*), almeirão Pão de Açúcar (*C. intybus*), siratro (*Macroptilium atropurpureum*) e tanchagem (*Plantago sp.*) foram desinfestadas em solução de 50% de hipoclorito de sódio (estoque 2,5%), 50% de água estéril e 20µL de Tween 20 por 20 minutos. Em seguida, lavadas em água destilada autoclavada, por cinco vezes e cultivadas em meio MS (2,9 g/L MS sais, 30 g/L sacarose, 100 mg/L myo-inositol, 3 g/L phytigel, 1 mL/L vitaminas MS, 2 mg/L glicina, pH 5.6) para germinação (30 sementes por placa). As placas foram incubadas em câmara de crescimento a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas luz e 8 horas escuro. As sementes que germinaram foram transferidas para frascos Magenta (Sigma – Brasil) contendo o mesmo meio de cultura (MS) até atingirem um comprimento de aproximadamente 4-5 cm.

### Preparo de *Agrobacterium rhizogenes*

As cepas de *A. rhizogenes* R1601, 2659, 8196 e A4, mantidas em freezer a -80 °C, foram estriadas em placas de petri contendo meio YEP (5 g/L extrato de levedura, 10 g/L peptona, 5 g/L NaCl, 15 g/L bacto ágar) e crescidas por 48h a  $25 \pm 2$  °C. Colônias isoladas foram cultivadas novamente em meio

YEP e armazenadas em estufa a 19 °C por 4 dias. Para a transformação dos segmentos de hipocótilo ou de folhas, a *A. rhizogenes* foi retirada da placa de petri com auxílio de uma alça de platina e suspensa em 10 mL de meio de infecção (2 g/L N6 sais, 68,5 g/L sacarose, 36 g/L glicose, 0,7 g/L prolina, 0,5 g/L MES, 1 mL vitaminas de N6, pH 5.2) contidos em tubos Falcon de 50 mL até uma OD<sup>600</sup> de aproximadamente de 0,5. Foram adicionados 100 µM de acetoseringona em cada frasco e estes foram incubados a 23 °C por 2 h.

### **Infecção das plântulas com as diferentes estirpes de *Agrobacterium rhizogenes***

Para a transformação das diferentes espécies de plântulas, 3 placas com 20 segmentos cada de aproximadamente 1 cm de hipocótilo de cenoura e de almeirão e 3 placas com 20 frações de 1 cm X 0,5 cm de folhas de siratro e tanchagem foram imersas em meio de infecção contendo *A. rhizogenes* por 5 minutos. Em seguida, colocados em placas contendo o meio de cocultivo (2 g/L N6 sais, 30 g/L sacarose, 0,7 g/L prolina, 0,5 g/L MES, 1 mL vitaminas de N6, 0,85 mg/L AgNO<sub>3</sub>, 400 mg/L L-cisteína, 100 µM acetoseringona), pH 5.8 a 20 °C por 3 dias. Após o cocultivo, o material vegetal foi transferido para placas de petri contendo meio MS suplementado com o antibiótico Cefotaxima (250 mg/L) e estas foram armazenadas no escuro a 25 ± 2 °C. A cada duas semanas, os hipocótilos foram transferidos para novo meio MS, até o aparecimento de raízes, aproximadamente 3 a 4 semanas. Raízes formadas foram individualizadas em placas de petri contendo meio MS suplementado com o antibiótico Cefotaxima (250 mg/L). Raízes com crescimento vigoroso foram selecionadas para caracterização molecular.

### **Análise molecular das raízes geradas**

O DNA de raízes transformadas foi extraído de acordo com Sambrook et al. (1989). Os clones de raízes selecionados foram analisados para a presença dos genes *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*, *virD1*, *VirG*, *aux1* e *aux2* de *A. rhizogenes* (Tabela 1).

Para a reação de PCR foram utilizados DNA (1µl), Tampão (2,0 µl), MgCl<sub>2</sub> (0,8 µl), DNTPs (1,0 µl), primer F (1µl) e primer R (1µl), TAQ (0,3 µl) e H<sub>2</sub>O (11,9 µl). O ciclo de amplificação foi de 94 °C por 15 segundos (35 vezes), 60

°C por 10 segundos (35 vezes) e 72 °C por 15 segundos (35 vezes); 72 °C em 5 minutos e 4° até o desligamento do termociclador.

**Tabela 1.** Primers utilizados para a detecção do Ri T-DNA nas raízes transformadas

Genes	Primers (5' – 3')	PCR pb	Referência
rolA	ACG GTG AGT GTG GTT GTA GG GCC ACG TGC GTA TTAATC CC	403	Slightom et al. (1986)
rolB	GCT CTT GCA GTG CTA GAT TT GAA GGT GCA AGC TAC CTC TC	383	Furner et al. (1986)
rolC	CTC CTG ACA TCA AAC TCG TC TGC TTC GAG TTA TGG GTA CA	586	Furner et al. (1986)
rolD	TGC CTT GAG GTC ATT CAT CAA GGC C ATG GAC TGA AGG AGC ACT CAT TGG C	741	Slightom et al. (1986)
aux1	CTC CGA TTC CTT TCC AAC CG CGC ACG TTA TCC TCA TAC CC	791	Camilleri e Jouanin (1991)
aux2	CTG TCA ACG GAG GCT GTT GGG ACC CTA GTC TCA TCC CAG GG	722	Camilleri e Jouanin (1991)
virD1	ATG TCG CAA GGA GCT AAG CCG A GGA GTC TTT CAG CAT GGA GCAA	450	Alpizar et al. (2008)
virG	ACT GAA TAT CAG GCAACG CC GCG TCA AAG AAA TAG CCA GC	350	Alpizar et al. (2008)

## Resultados e Discussão

### Culturas de raízes

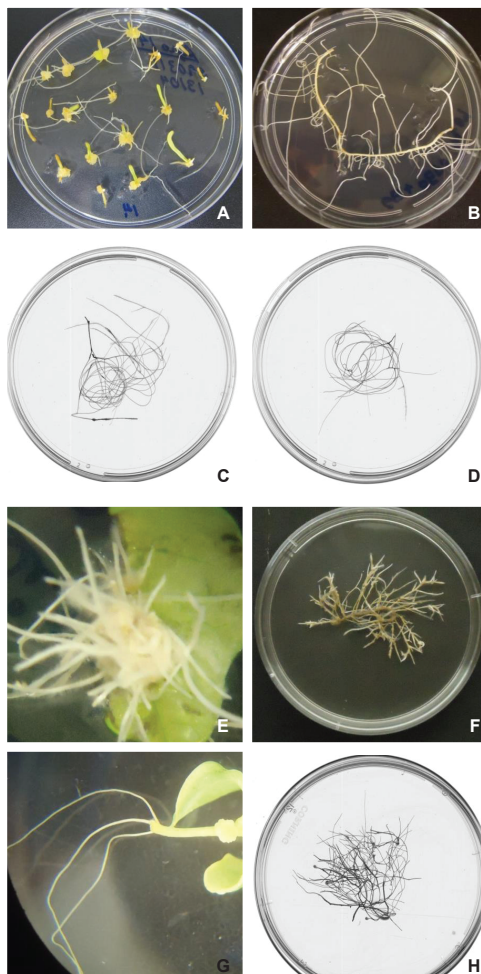
Todas as cepas de *Agrobacterium rhizogenes* utilizadas foram capazes de gerar raízes transformadas a partir da infecção das diferentes espécies de plantas utilizadas, exceto a cepa 8196, que, nas condições utilizadas neste trabalho, não foi capaz de infectar a cultivar de almeirão Pão de Açúcar e a

cultivar de siratro, e as cepas A4 e 2659, que não foram capazes de infectar os segmentos de folhas de siratro (Figura 1, Tabela 2). Todas as cepas de *A. rhizogenes* produziram raízes capazes de crescer em meio de cultivo sem reguladores de crescimento vegetal (Figura 1). O número de raízes produzidas pelas cepas R1601, A4, 8196 e 2659 está reportado na Tabela 2; a cepa R1601 foi, em média, significativamente superior em número de transformações do que a cepa 2659, não havendo diferenças significativas entre as demais cepas (Tabela 2). Em todas as transformações, independentemente da espécie de planta utilizada, houve a formação de poucas raízes no controle negativo não transformado. No entanto, estas raízes, após serem cultivadas em meio sem reguladores de crescimento vegetal, não foram capazes de continuar o seu desenvolvimento. Numericamente, a cepa R1601 induziu mais raízes transformadas em cenoura, na cultivar de almeirão Pão de Açúcar e em hipocótilo de tanchagem (Tabela 2). Já a cepa A4 tendeu a induzir mais raízes quando inoculada em hipocótilo da cultivar de almeirão Folha Larga (Tabela 2). Tanto a cultivar de cenoura quanto a de tanchagem produziram uma grande quantidade de raízes após a infecção com as diferentes cepas de *A. rhizogenes* (Tabela 2). As cepas R1601 e A4 foram as que induziram mais raízes nas diferentes espécies estudadas. O plasmídeo Ri das cepas A4 e R1601 é do tipo agropina, que contém duas regiões no T-DNA (TL e TR), que são transferidas para a célula vegetal. *A. rhizogenes* do tipo agropina é considerada a mais eficiente no processo de transformação (Jouanin, 1984; Combard et al., 1987; Oksman-Caldentey; Hiltunen, 1996; Otani et al., 1993). A estirpe 8196 possui plasmídeo Ri do tipo manopina e a estirpe 2659 do tipo cucumopina (Dobigny et al., 1995). Cepas que possuem plasmídeo do tipo cucumopina são menos eficientes no processo de indução de raízes, pois não possuem a região TR T-DNA que contém genes de indução de tumor (isto é, síntese de auxina *tms1* e *tms2*) (Jouanin, 1984; Combard et al., 1987; Dobigny et al., 1995).

Levantamento na plataforma Web of Science (2019), realizado em novembro 2019, não resultou em registros de trabalhos realizados com a produção raízes Ri T-DNA para siratro. Já para tanchagem (*Plantago* sp.) existe um artigo publicado (Fons et al., 1999), porém, o protocolo de transformação utilizou raízes como material para transformação. O protocolo proposto aqui utiliza tecido da parte aérea (folhas e hipocótilo). Para cenoura, o protocolo padrão utiliza a infecção de tecido do câmbio obtido de raízes tuberosas



(Danesh et al., 2006), porém, o processo de desinfestação e processamento de raízes de tuberosas de cenoura é trabalhoso e pouco eficiente. Neste estudo, a transformação de cenoura foi realizada a partir de tecidos da parte aérea de plântulas obtidos após germinação de sementes desinfestadas, facilitando, assim, a obtenção de material livre de contaminantes e suscetíveis ao processo de transformação.



**Figura 1. Indução do desenvolvimento de raízes em plantas infectadas com *Agrobacterium rhizogenes*.** (A e B) cenoura / *Daucus carota*; (C e D) tanchagem / *Plantago* sp.); (E e F) siratro / *Macroptilium atropurpureum*; (G e H) almeirão / *Cichorium intybus*.

**Tabela 2. Número de raízes induzidas após infecção com *Agrobacterium rhizogenes***

Cultivar / Tecido vegetal	Número de raízes formadas			
	-- Cepas de <i>A. rhizogenes</i> --			
	R1601	A4	8196	2659
Cenoura Planalto / Hipocótilo	96	77	50	25
Almeirão Folha Larga / Hipocótilo	3	10	4	8
Almeirão Pão de Açúcar / Hipocótilo	3	1	0	1
Siratro / Folha	12	0	0	0
Tanchagem / Folha	48	67	66	65
Tanchagem / Hipocótilo	66	24	36	14
Total de raízes induzidas	228	179	156	113
Médias	38,0a	29,8ab	26,0ab	18,8b

Médias seguidas da mesma letra minúscula não são estatisticamente diferentes (LSD  $P < 0,05$ ), valores de probabilidade para One-Way ANOVA.

## DNA e PCR das Raízes de cenoura

Raízes de cada uma das diferentes cultivares de plantas utilizadas, que apresentaram crescimento vigoroso e independente de hormônios vegetais em meio de cultivo, foram selecionadas para análises moleculares. A Tabela 3 apresenta os resultados observados para avaliação da presença dos genes *rol* e *vir* nas amostras de DNA de culturas de raízes de cenoura, almeirão e tanchagem. Raízes induzidas em folhas de tanchagem foram as únicas onde foram detectados mais de dois genes *rol*. No clone de cenoura foi possível amplificar os genes *rolB* e *rolC*, enquanto no de almeirão foi amplificado o gene *rolA*. Em nenhum dos clones foram amplificados os genes *virD1* e *virG*, o que era esperado, já que o gene em questão só auxilia na transferência do T-DNA. Este resultado comprova que as raízes produzidas estavam livres de contaminação com *A. rhizogenes*. A Figura 2 é um exemplo do resultado obtido para a amplificação de amostras de DNA das diferentes culturas de raiz produzidas, sendo que este resultado foi gerado com DNAs extraídos de 14 diferentes culturas de raízes induzida pela *A. rhizogenes* R1601 em folhas

de tanchagem. Apenas em cinco culturas de raízes foram detectados três genes *rol*, nas demais foram amplificados 1 ou 2 dos genes *rol*.

A transformação de cenoura a partir de plântulas obtidas de sementes, conforme descrito neste estudo, apresenta vantagens em relação à transformação a partir de raízes e raízes tuberosas, como facilidade de desinfestação e rapidez, tanto em relação a resposta a indução quanto à não necessidade do cultivo de cenoura para obtenção de tubérculos.

Até onde sabemos, o protocolo para transformação de siratro por Ri T-DNA é relatado pela primeira vez neste estudo. Já os protocolos para transformação de cenoura, tanchagem e almeirão foram desenvolvidos, aqui, para o uso de material da parte aérea obtido a partir da germinação de sementes desinfestadas. Esta é uma vantagem em relação à utilização de tecidos obtidos de raízes e/ou raízes tuberosas.

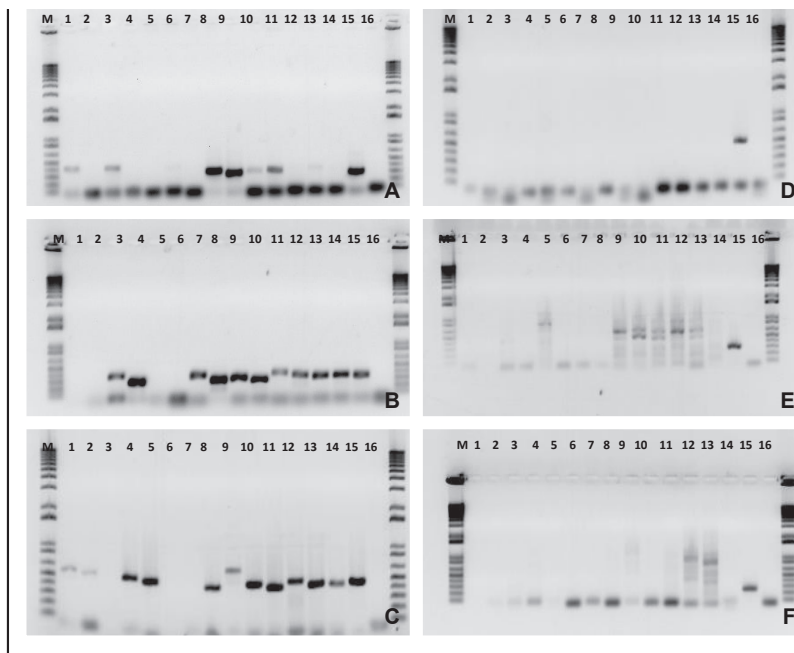
**Tabela 3. Genes detectados em raízes induzidas após infecção com *Agrobacterium rhizogenes***

Genes	Cenoura	Almeirão	Siratro	Tanchagem
<b>rol A</b>	-	+	na	+
<b>rol B</b>	+	-	na	+
<b>rol C</b>	+	-	na	+
<b>rol D</b>	-	-	na	-
<b>vir D</b>	-	-	na	-
<b>vir E</b>	-	-	na	-

na – não analisado

- negativo – não detectado após análise por PCR

+ positivo – detectado após análise por PCR



**Figura 2. Amplificação pela PCR de DNA genômico de culturas de raízes de tanchagem induzidas após infecção com *Agrobacterium rhizogenes* cepa R1601.** (A) Primer rolA; (B) Primer rolB; (C) Primer rolC; (D) Primer rolD; (E) Primer virD1; (F) Primer virG. M – marcador molecular (1 Kb); (1 a 14) Amostras de DNA de diferentes culturas de raízes de tanchagem; (15) DNA total de *A. rhizogenes* cepa R1601; (16) Branco.

## Conclusões

As cepas de *A. rhizogenes* produziram linhagens de culturas de órgãos radiculares Ri T-DNA capazes de crescer em meio de cultivo sem reguladores de crescimento vegetal.

A cepa R1601 foi a mais eficiente para a indução de raízes transformadas nas cultivares de cenoura, almeirão, siratro e tanchagem.

Protocolo utilizando tecidos obtidos da parte aérea de plântulas foi validado.

## Agradecimentos

---

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelo financiamento concedido ao projeto 02.16.05.024.00.00.

## Referências

---

ALPIZAR, E.; DECHAMP, E.; LAPEYRE-MONTES, F.; GUILHAUMON, C.; BERTRAND, B.; JOURDAN, C.; LASHERMES, P.; ETIENNE, H. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. **Annals of Botany**, v. 101, p. 929-940, 2008.

ALPIZAR, E.; DECHAMP, E.; ESPEOUT, S.; ROYER, M.; LECOULS, A. C.; NICOLE, M.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; ETIENNE, H. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 959-967, 2006.

BAHRAMNEJAD, B.; NAJI, B.; BOSE, R.; JHA, S. A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 7, article 107401, 2019.

BÉCARD, G.; FORTIN, J. A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. **New Phytologist**, v. 108, p. 211-218, 1988.

BOISSON-DERNIER, A.; CHABAUD, M.; GARCIA, F.; B'ECARD, G.; ROSENBERG, C.; BARKER, D. G. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 6, p. 695-700, 2001.

BOSELUT, N.; GHELDER, C. V.; CLAVERIE, M.; VOISIN, R.; ONESTO, J. P.; ROSSO, M. N.; ESMENJAUD, D. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Prunus* as an alternative for gene functional analysis in hairy-roots and composite plants. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 7, p. 313-326, 2011.

CAMILLERI, C.; JOUANIN, L. The TR-DNA region carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 4, n. 2, p. 155-162, 1991.

CHILTON, M. D.; TEPFER, D. A.; PETIT, A.; DAVID, C.; CASSE-DELBART, F.; TEMPE, J. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. **Nature**, v. 295, p. 432-434, 1982.

COMBARD, A. Homology study demonstrates collinear organization of the transferred regions of plasmids pRi1855 and pRi8196 from *Agrobacterium rhizogenes*. **Plasmids**, v. 17, p. 137-148, 1987.

DANESH, Y. R.; GOLTAPPEH, E. M.; ALIZADEH, A.; SANAVY, M. M. Optimizing carrot hairy root production for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi in Iran. **Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 87-91, 2006.

DILLEN, W.; DE CLERCQ, J.; GOOSSENS, A.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus acutifolios* A. Gray. **Plant Journal**, v.12, p. 1459-1463, 1997.

DOBIGNY, A.; AMBROISE, A.; HAICOUR, R.; DAVID, C.; ROSSIGNOL, L.; SIHACHAKR, D. Transformation of potato using mannopine and cucumopine strains of *Agrobacterium rhizogenes*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 225-230, 1995.

DOUDS, D. D. Increased spore production by *Glomus* intraradices in the split-plate monoxenic culture system by repeated harvest, gel replacement, and resupply of glucose to the mycorrhiza. **Mycorrhiza**, v. 12, p. 163-167, 2002.

FONS, F.; TOUSCH, D.; RAPIOR, S.; GUEIFFIER, A.; ROUSSEL, J. L.; GARGADENNEC, A.; ANDARY, C. Phenolic profiles of untransformed and hairy root cultures of *Plantago lanceolata*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 291-296, 1999.

FRAME, B. R.; MCMURRAY, J. M.; FONGER, T. M.; MAIN, M. L.; TAYLOR, K. W.; TORNEY, F. J.; PAZ, M. M.; WANG, K. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 1024-1034, 2006.

FURNER, I. J.; HUFFMAN, G. A.; AMASINO, R. M.; GARFINKEL, D. J.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. **Nature**, v. 319, p. 422-427, 1986.

GAI, Q.-Y.; JIAO, J.; LUO, M.; WEI, Z.-F.; ZU, Y.-G.; MA, W.; FU, Y.-J. Establishment of hairy root cultures by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Isatis tinctoria* L. for the efficient production of flavonoids and evaluation of antioxidant activities. **PLoS One**, v. 10, n. 3, e0119022, 2015.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 223-256, 2000.

GIRI, A.; BANERJEE, S.; AHUJA, P. S.; GIRI, C. C. Production of hairy roots in *Aconitum heterophyllum* wall. Using *Agrobacterium rhizogenes*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 33, n. 4, p. 280-284, 1997.

GIRI, A.; NARASU, M. L. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 1, p. 1-22, 2000.

GUIMARÃES, L. A.; PEREIRA, B. M.; ARAÚJO, A. C. G.; GUIMARÃES, P. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Ex vitro hairy root induction in detached peanut leaves for plant-nematode interaction studies. **Plant Methods**, v. 13, article 25, 2017.

HO-PLÁGARO, T.; HUERTAS, R.; TAMAYO-NAVARRETE, M. I.; OCAMPO, J. A.; GARCIA-GARRIDO, J. M. An improved method for *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of tomato suitable for the study of arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant Methods**, v. 14, article 34, 2018.

HUFFMAN, G. A.; WHITE, F. F.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. Hairy-root-inducing plasmid: physical map and homology to tumor-inducing plasmids. **Journal of Bacteriology**, v. 157, n. 1, p. 269-276, 1984.

IONKOVA, I.; FUSS, E. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and lignan production in *Linum tauricum* ssp. *tauricum*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 5, n. 17, p. 14-18, 2009.

JOHN, R.; SHAJITHA, P. P.; DEVASSY, A.; MATHEW, L. Hairy-root cultures of *Achyranthes aspera* Linn. as a novel route for the production of 20-hydroxyecdysone. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 12, p. 1-9, 2017.

JOUANIN, L. Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids. **Plasmid**, v. 12, n. 2, p. 91-102, 1984.

KUMAR, V.; SHARMA, A.; PRASAD, B. C. N.; GURURAJ, H. B.; RAVISHANKAR, G. A. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 349-357, 2006.

LE FLEM-BONHOMME, V.; LAURAIN-MATTAR, D.; FLINIAUX, M. A. Hairy root induction of *Papaver somniferum* var. album, a difficult to transform plant, by *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402. **Planta**, v. 218, p. 890-893, 2004.

LORENCE, A.; MEDINA-BOLIVAR, F.; NESSLER, C. L. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots. **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 437-441, 2004.

MATSUKI, R.; ONODERA, H.; YAMAUCHI, T.; UCHIMIYA, H. Tissue-specific expression of the *roC* promoter of the Ri plasmid in transgenic rice plants. **Molecular and General Genetics**, v. 22, n. 1, p. 12-16, 1989.

MEHROTRA, S.; SRIVASTAVA, V.; UR RAHMAN, L.; KUKREJA, A. K. Hairy root biotechnology: indicative timeline to understand missing links and future outlook. **Protoplasma**, v. 252, n. 5, p. 1189-1201, 2015.

OTANI, M.; MII, M.; HANDA, T.; KAMADA, H.; SHIMADA, T. Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lom.) plants by *Agrobacterium rhizogenes*. **Plant Science**, v. 94, p. 151-159, 1993.

OKSMAN-CALDENTY, K. M.; HILTUNEN, R. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. **Field Crop Research**, v. 45, p. 57-69, 1996.

PARK, S.-U.; FACCHINI, P. J. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 347, p. 1005-1016, 2000.

PANDA, B. M.; MEHTA, U. J.; HAZRA, S. Optimizing culture conditions for establishment of hairy root culture of *Semecarpus anacardium* L. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.



RACHAMALLU, R. R. Hairy roots production through *Agrobacterium rhizogenes* genetic transformation from *Daucus carota* explants. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 3, n. 8, p. 23-27, 2016.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory**. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SEVÓN, N.; OKSMAN-CALDENTEY, K.-M. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. **Planta Medica**, v. 68, n. 10, p. 859-868, 2002.

SHARMA, S.; SHARMA, S.; AGGARWAL, A.; SHARMA, V.; SINGH, M.; KAUSHIK, S.

Mass multiplication of arbuscular mycorrhizal fungi. In: AGGARWAL, A; YADAV, K. (Ed.). **Mycorrhizal fungi**. New Delhi: Astral International, 2017. p. 157-174.

SHANKS, J. V.; MORGAN, J. Plant 'hairy root' culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 151-155, 1999.

SHEN, W. H.; PETIT, A.; GUERN, J.; TEMPE, J. Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 10, p. 3417-3421, 1988.

SHI, H. P.; QI, Y.; ZHANG, Y.; LIANG, S. Induction of cucumber hairy roots and effect of cytokinin 6-BA on its growth and morphology. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 514-520, 2006.

SLIGHTOM, J. L.; DURAND-TARDIF, M.; JOUANIN, L.; TEPFER, D. Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid: identification of open-reading frames. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 1, p. 108-121, 1986.

SOUZA, F. A.; BERBARA, R. L. L. Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri T-DNA transformed roots. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 343-350, 1999.

TIWARI, R. K.; TRIVEDI, M.; GUANG, Z. C.; GUO, G. Q.; ZHENG, G. C. Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in

transformed hairy root cultures. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 2, p. 199-210, 2007.

WEB OF SCIENCE. [**Base de dados**]. Filadélfia: Clarivaty Analytics, 2019. Disponível em: <[http://apps-webofknowledge.ez103.periodicos.capes.gov.br/WOS\\_GeneralSearch\\_input.do?product=WOS&search\\_mode=GeneralSearch&SID=8B7fgGphXloFDpCDP7t&preferencesSaved=>](http://apps-webofknowledge.ez103.periodicos.capes.gov.br/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=8B7fgGphXloFDpCDP7t&preferencesSaved=>)>. Scesso em: 13 nov. 2019.

WHITE, F. F.; GHIDOSI, G.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 10, p. 3193-3197, 1982.

WHITE, F. F.; TAYLOR, B. H.; HUFFMAN, G. A.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. Molecular e genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium-rhizogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 164, n. 1, p. 33-44, 1985.

XU, H.; ZHOU, X; LU, J.; WANG, J.; WANG, X. Hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* and production of regenerative plants in hairy root cultures in maize. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 49, n. 4, p. 305-310, 2006.

ZUPAN, J.; ZAMBRYSKI, P. The *Agrobacterium* DNA transfert complex. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 16, n. 3, p. 279-295, 1997.

**Embrapa**

---

**Milho e Sorgo**



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO

