

PRODUÇÃO DE RAÍZES TRANSFORMADAS DE PIMENTA-LONGA POR INFECÇÃO COM
*AGROBACTERIUM RHIZOGENES**Production of transformed roots of long pepper by Agrobacterium rhizogenes infection*José Nicomedes Júnior¹; Roberta Cristiane Ribeiro²; Ricardo Luis Louro Berbara³; Elvia Mariam Lis Martinez Stark⁴;
Wagner Campus Otoni⁵; Sonia Regina Souza^{6*}¹ Engenheiro Agrônomo; Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguêz de Mello, CENPES; Departamento de Solos; Universidade Federal Rural do Rio Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ, Brasil; e-mail: nicomedes@petrobras.com.br² Pós-doutoranda; Departamento de Solos; Universidade Federal Rural do Rio Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ, Brasil; e-mail: roberta.ribeiro@srs.ifmt.edu.br³ Professor; Departamento de Solos; Universidade Federal Rural do Rio Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ, Brasil; e-mail: berbara@ufrj.br⁴ Engenheira Florestal; Departamento de Solos; Universidade Federal Rural do Rio Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ, Brasil; e-mail: mlistark@yahoo.com⁵ Professor; Departamento de Biologia Vegetal; Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil; e-mail: wotoni@ufv.br⁶ Professor; Departamento de Química; Universidade Federal Rural do Rio Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ, Brasil; e-mail: soniabq@ufrj.br

*Autor para correspondência

Artigo enviado em 05/06/2017, aceito em 19/09/2017 e publicado em 20/12/2017.

Resumo – Este trabalho teve por objetivo a obtenção de raízes transgênicas (*bairy roots*) de *Piper hispidinervium* (pimenta-longa), espécie reconhecida pela produção de óleo essencial rico em Safrol, metabólito secundário utilizado com fins terapêuticos e industrial. As raízes foram produzidas a partir da infecção de explantes *in vitro* de pimenta-longa com *Agrobacterium rhizogenes* (Estirpe R1601). Os resultados mostraram que a estirpe R1601 de *A. rhizogenes* foi eficiente para inoculação baseado na imersão de explantes em meio de cultura líquido, com a bactéria em crescimento, o que representou maior praticidade, menor índice de contaminação, maior taxa de infecção e menores danos aos explantes. A resposta morfológica foi a mesma entre os clones, não permitindo a distinção dos mesmos. Explantes de folha de pimenta-longa, inoculados com a estirpe R1601, formaram raízes que apresentaram crescimento nos subcultivos subsequentes.

Palavras-chave - *Piper hispidinervium*, cultura de raízes, metabolitos secundários, cultivo *in vitro*.

Abstract – This work aimed to obtain transformed roots of *Piper hispidinervium* (long pepper) specie recognized for the production of Safrol-rich essential oil, a substance already used for therapeutic and industrial purposes. The roots were obtained from the infection of the plants with strain R1601 of the bacterium *Agrobacterium rhizogenes*. The results show that *A. rhizogenes* strain R1601 was very efficient for inoculation based on the immersion of explants in liquid culture medium, with the growing bacterium, because it presents greater practicality, lower contamination index, higher infection rate and what causes less damage to the explants. A morphological response was observed that did not allow the clones to be distinguished from each other. Long pepper leaf explants, inoculated with strain R1601, formed roots that showed growth in subsequent subcultures.

Keywords - *Piper hispidinervium*, root culture, second metabolites, *in vitro* culture.

INTRODUÇÃO

Piper hispidinervium (C. DC.) ou pimenta-longa, como é conhecida popularmente é uma espécie vegetal muito difundida na região amazônica do Brasil. Essa planta se destaca pela alta produção de óleo essencial, muito rico no metabólito secundário denominado 4-alil-1,2-metilenodioxibenzeno (Safrol). Trata-se de uma substância volátil com grande importância na indústria farmacêutica e cosmética (PESCADOR et al., 2000; BRAGA; CREMASCO, 2016). É interessante observar que a descoberta dessa fonte em potencial de Safrol, se deu em função de pesquisas cujo objetivo foi reverter as consequências extrativistas que diminuíram a disponibilidade da espécie *Ocotea odorifera* popularmente chamada de canela-sassafrás ou sassafrás. Que pela extração indiscriminada e devido a grande quantidade de material vegetal requerido para atender a demanda de Safrol, em escala industrial, fez com que a canela de sassafrás entrasse para o rol de espécies ameaçadas de extinção (PESCADOR et al., 2000; MORAIS et al., 2012). A exploração desta espécie tem como agravante o fato de que a substância se encontra em grandes quantidades nas raízes, sendo necessária a extração completa da planta, favorecendo assim sua extinção.

Métodos alternativos para a produção de metabólitos têm sido estudados, e a cultura de tecidos e órgãos vegetais se tornaram ferramentas de grande funcionalidade nesse processo (MORAIS et al., 2012; FILOVÁ, 2014; GAI et al., 2015). Além da cultura de células em suspensão, muitas outras técnicas foram desenvolvidas e estudadas para produção de compostos alvo, como o cultivo de calos e parte aérea, bem como o co-cultivo desses diferentes órgãos e tecidos vegetais. A cultura de raízes transformadas (*hairy roots*) tem demonstrado resultados significativos na produção, em larga escala industrial, de metabólitos secundários específicos (TIAN, 2015). Essa técnica se baseia na infecção de espécies vegetais por estirpes virulentas de *Agrobacterium rhizogenes* levando à formação de raízes adventícias que podem se propagar *in vitro*, sem a necessidade de acréscimo externo de reguladores de crescimento, pois há a transferência de genes do procarioto para a planta que modifica o metabolismo de auxinas e citocininas e leva ao desenvolvimento de raízes (GEORGIEV et al., 2012; COSTA et al., 2013; NESTER, 2015).

Quando se analisa a grande maioria dos estudos fitoquímicos e se compara qual parte da planta é a mais utilizada para a extração de metabólitos, se percebe a tendência para o uso da parte aérea, sendo a porção radicular a menos estudada (SOUZA FILHO et al., 2011). Isso porque estudos demonstram que os tecidos fotossintéticos possuem maior produção de metabólitos. No entanto, já foram descritas condições de estresse ambiental, onde a plasticidade fenotípica das plantas proporciona a alocação dessa maior produção de metabólitos secundários, para as raízes (MARTIN, 2014).

Dentre os fatores que contribuem para o limitado estudo com raízes, está principalmente a difícil extração das mesmas. Porém, essa limitação pode ser superada com o uso de raízes transformadas (*hairy roots*), o que possibilita a produção, em condições controladas (sistema fechado), permitindo plena estabilidade, uniformidade e rapidez na produção de substâncias químicas (NESTER, 2015).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar metodologias de produção de raízes transformadas (*hairy root*) de *Piper hispidinervium* (pimenta-longa).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos explantes vegetais

Sementes de pimenta-longa (*P. hispidinervium*) foram obtidas junto a EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa da Amazônia Oriental, tendo sido colhidas em campo experimental de produção. As sementes foram desinfestadas por imersão em álcool etílico a 70% (v/v) por 60 segundos, pela imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) acrescidos de 1% (v/v) de Tween 20, por 20 minutos, seguidas de três enxagues em água destilada estéril, adaptado de Toki et al. (2006). Em seguida, as sementes foram inoculadas em meio de cultura composto da metade da concentração dos sais básicos do meio MS, e suplementados pelo complexo vitamínico B5, 50 mg l⁻¹ de mio-inositol, 2% (p/v) de sacarose, 0,8% (p/v) de ágar (Sigma Chemical Co., USA) sendo o pH ajustado em 5,7±0,1 antes da autoclavagem. Aproximadamente 50 ml meio de cultura foram vertidos em frascos de vidro de 350 ml de capacidade e vedados com tampas de polipropileno. Após o processo de autoclavagem e solidificação do meio, foram inoculadas, em média, 25 sementes por frasco, sendo preparados 10 frascos. As culturas foram transferidas para sala de crescimento com radiação de 36 μmoles m⁻²s⁻¹, temperatura de 26±2 °C, e fotoperíodo de 16 horas (lâmpada Gro-Lux Sylvania intercalada com lâmpadas fluorescentes, Luz do dia especial, 20 W, Osram, Brasil).

Plântulas de 60 dias de idade, contados a partir da emissão de radícula, foram utilizadas como fonte de explantes. Para obtenção dessas plântulas no processo de inoculação com *A. rhizogenes* foram usados segmentos de caule de um (1) cm, originados de plantas provenientes de sementes germinadas em meio MS a ½ força iônica. Oito segmentos de caule foram colocados por frasco contendo 35 mL de meio MS sólido.

As plântulas foram retiradas do meio de cultura, e sob condições assépticas, utilizadas para os trabalhos de transformação. As mesmas foram dissecadas e suas folhas e caule individualizados. Das folhas retirou-se o pecíolo e as bordas, para aumentar a exposição das células vegetais à *Agrobacterium*. Os explantes de folha foram retirados de plantas

cultivadas *in vitro*, a partir de sementes, de *P. hispidinervium*.

Obtenção da linhagem de *Agrobacterium*

A bactéria *A. rhizogenes* R1601 contendo o gene *npII* sob o controle do promotor CaMV 35S foi utilizada para os experimentos de transformação. A mesma foi obtida junto a Universidade Federal de Viçosa - UFV.

A linhagem R1601 é uma linhagem de laboratório obtida por conjugação *in vitro*, conforme descrito a seguir: da bactéria C58 de *Agrobacterium tumefaciens* foi retirado o plasmídeo Ti. A bactéria sem o plasmídeo passou a se chamar A136, que é resistente a rifampicina. Esta linhagem produz agropina (pRiA4). No plasmídeo Ri da linhagem A4 de *A. rhizogenes* foi clonado o gene *npII* (para expressão em planta) e o gene para resistência a ampicilina (por seleção na bactéria). O plasmídeo resultante é o R1500. Posteriormente foi introduzido na linhagem R1500 o cosmídeo pTVK291, que contém parte da região vir do plasmídeo pTiBo542 e que confere um fenótipo supervirulento.

Obtenção do inóculo de *Agrobacterium*

A *Agrobacterium* foi colocada para crescer no meio de cultura Rhizo, por 24 horas, com ou sem a adição do ácido fenólico ácido 3-(4-hidróxi-3,5-dimetóxi)prop-2-enóico, conhecido como ácido sinapínico (20 µM), um derivado do ácido hidroxicinâmico. Foram usados frascos erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio Rhizo líquido, suplementado com 100 mg.L⁻¹ do antibiótico 2-aminometil-6-[4,6-diamino-3-[4-amino-3,5-diidroxi-6-hidroxiacetil]tetrahidropirano-2-il]oxi-2-hidroxiciclofenil]-tetrahidropirano-3,4,5-triol (canamicina) e 100 mg.L⁻¹ do antibiótico (2S, 5R, 6R)-6-[[2(R)-2-amino-2-fenilacetil]amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tial-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-ácido carboxílico (ampicilina).

Desse meio foram retiradas alíquotas para verificação da densidade óptica a 600 nm, padronizada entre 0,5 e 0,6.

A concentração de ácido sinapínico utilizada foi 20 µM (0,00448 g.L⁻¹). As folhas foram imersas no meio Rhizo, com e sem ácido sinapínico, por cerca de 10 minutos (STACHEL et al., 1985).

Os explantes foram colocados em meio B5 ½ força iônica por 24 horas, mantido a 25°C, no escuro. Os explantes foram então lavados em água destilada estéril, e colocados em placas de Petri contendo meio B5 ½ força iônica, suplementado com 500 mg.L⁻¹ de (6R,7R) -3-(acetiloximetil)-7-[[2(Z)-2-(2-amino-1,3-tiazol-4-il)-2-metoximinoacetil]amino]-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo [4.2.0]oct-2-ene-2-carboxílico ácido (cefotaxima). Foram colocados oito explantes por placa, sendo ao todo 40 explantes distribuídos em

cinco placas. Esses explantes foram mantidos a 25°C, no escuro até o surgimento de raízes a partir dos sítios de infecção.

Repicagem e manutenção de calos e raízes

As raízes que surgiram a partir dos sítios de infecção foram excisadas e transferidas para placas de Petri, contendo meio B5 ½ força iônica acrescido de 500 mg.L⁻¹ de cefotaxima sódica, que foi, gradativamente, retirada do meio, até completa eliminação das agrobactérias.

Os calos e as raízes obtidas foram cultivados em placas de Petri contendo meio B5 sólido ½ força iônica, e quantidades de antibiótico cefotaxima que foi, gradativamente, retirada do meio, até completa eliminação das agrobactérias. A concentração inicial do antibiótico no meio foi de 500 mg.L⁻¹, sendo reduzida à metade a cada repicagem. Foram feitas três repicagens com intervalo de 45 dias.

Caracterização da transformação gênica

Para a confirmação das raízes transformadas foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se iniciadores 'primers' específicos para o gene *npII* (neomicina fosfotransferase II): NPT f (T C A G C G C A G G G G C G C C C G G T T) e NPT r (G C G G T C A G C C C A T T C G C C G C C) e ("Life Technologies, Inc.", Rockville, EUA). O DNA genômico de raízes de regenerantes foi extraído, segundo metodologia de Ferreira e Grattapaglia (1998), e utilizado para confirmação dos transformantes. As reações de amplificação foram realizadas com volume total de 25 µl, com 100 µM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 10 mM de tampão (Tris KCl, pH 8,3); 2 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada 'primer'; 50 mM de KCl, 20 ng de DNA; e 1 u/µl de Taq DNA polimerase.

Como controle negativo foi utilizado DNA de tecidos vegetais de pimenta-longa não transformados e como controle positivo plasmídeos purificados, contendo o gene *npII*.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1,0%, tampão TAE 0,5 X, e após coloração com brometo de etídio, a imagem foi capturada no sistema Eagle Eye (Stratagene).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de pimenta longa apresentaram 100% de germinação, iniciando a emergência das plântulas *in vitro* aos oito dias após a semeadura e estabilizando-se aos 25 dias.

O peso fresco médio das plantas foi de 0,280 g aos 60 dias após a germinação, menor que o peso fresco médio relatado por Pescador et al. (2000), que foi de 0,438 g no mesmo período. As plantas apresentaram crescimento lento em condições de

cultivo *in vitro*, atingindo em média 3,0 cm ao final de 60 dias. Demonstrando a necessidade de alternativas que acelerem a obtenção de biomassa *in vitro* dessa espécie vegetal.

Os explantes controle apresentaram oxidação e necrose a partir de 25 dias de montagem do experimento, havendo inclusive o escurecimento do meio de cultura ao redor dos mesmos. O mesmo não ocorreu com os explantes inoculados.

Na inoculação pela linhagem R1601 *A. rhizogenes* a pimenta longa demonstrou possuir baixa suscetibilidade à infecção. As primeiras raízes só começaram a surgir cerca de 30 dias após a infecção, sendo excisadas aos 50 dias. Nenhum explante controle (não inoculado) produziu raiz, sendo que 20% dos explantes inoculados com bactéria crescida no meio com ácido sinapínico produziram raiz, e 33% dos explantes inoculados com bactéria crescida no meio sem ácido sinapínico produziram raízes (Figura 1).

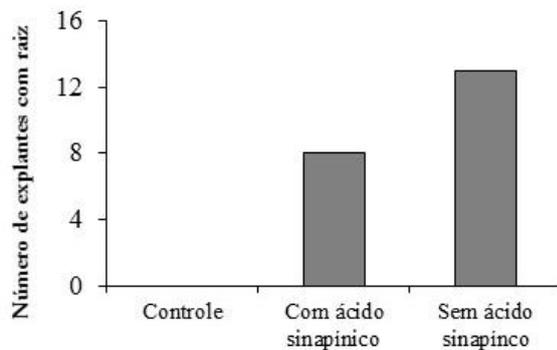


Figura 1. Número de explantes de folha de pimenta longa que produziram raízes quando inoculadas com a estirpe R1601 de *A. rhizogenes*, na presença ou ausência de 20 μ M de ácido sinapínico, 50 dias após inoculação.

Esses resultados contrariaram dados da literatura, uma vez que vários autores comprovaram efeito estimulador na infecção com o uso de compostos fenólicos, tais como o ácido sinapínico e a acetosiringona (BHATTACHARYA; SOOD; CITOVSKY, 2010).

Zhi e Alfermann (1993) observaram que o acréscimo de 20 μ M de acetosiringona ao meio de crescimento da linhagem R1601 de *A. rhizogenes*, aumentou de 10 para 33% a produção de raízes em explantes de folha de *Salvia miltiorrhiza*, em relação ao controle sem acetosiringona. Em um estudo comparando as concentrações de acetosiringona na infecção de *A. rhizogenes*, Srinivasan et al. (2014) concluíram que houve forte dependência da presença dessa substância na eficiência de transformação de raízes de *Daucus carota* L.. Segundo Subramoni et al. (2014) o ácido sinapínico apresenta efeito ativador da região vir de *Agrobacterium* muito similar ao da acetosiringona, quando administrados na mesma dose. Isso porque assim como a acetosiringona, o ácido sinapínico também pertence a classe dos fenólicos, o

que pode lhe conferir ação semelhante na via de ativação da cascata responsável pela virulência de *Agrobacterium*. No caso da acetosiringona, após seu reconhecimento ocorre a auto fosforilação do locus virA, região que codifica para uma proteína quinase que percebe a presença dos metabólitos da planta injuriada. Isso por sua vez desencadeia a fosforilação do VirG, que ativa a expressão de outros genes vir, levando ao processo de indução e transferência da fita-T para o DNA nuclear das células hospedeiras, consolidando o processo efetivo da integração. No presente trabalho essa resposta não pôde ser observada, uma vez que o ácido sinapínico não aumentou a infecção bacteriana e transformação gênica necessária à produção de raízes transformadas. Segundo o trabalho de Fortin, Nester e Dion (1992) com *Agrobacterium tumefaciens*, uma explicação poderia se dar pelo crescimento da estirpe sem plasmídeo Ti, o que a tornaria menos sensíveis a ação positiva do fenólico acetosiringona. Da mesma forma é provável que a capacidade de produzir mutantes avirulentos na presença de cetosiringona seja determinada pelo menos pelo plasmídeo Ti.

A partir das raízes desenvolvidas nos explantes de folha foram estabelecidas três culturas clonais de pimenta longa: PL1, PL2 e PL3 (Figura 2). As raízes apresentaram taxa de crescimento muito baixa e elevada taxa de oxidação quando em presença do antibiótico cefotaxima no meio, ainda que em concentrações mais baixas. Isso levou à perda de várias culturas clonais que haviam sido preparadas. De acordo com o estudo de Yepes e Aldwinckle (1994), o uso dos antibióticos cefotaxima e carbenicilina, sozinhos ou associados induziram dentre outras, a liberação de compostos fenólicos no meio. Isso explicaria a ocorrência de oxidação, uma vez que a partir da oxidação desses polifenóis são produzidos fortes oxidantes, como as quinonas, ocasionado tanto a oxidação como a necrose de explantes. Essa oxidação poderia ser evitada pela utilização de antioxidantes, como o ácido ascórbico, ácido cítrico, carvão ativado, polivinilpirrolidona (PVP).

Morfologicamente os clones não se distinguiram entre si. Apresentaram coloração pardo-amarelada, bem como ausência de pêlos mais finos recobrendo as raízes primárias e secundárias. As raízes primárias e secundárias são mais grossas e apresentaram poucas ramificações (Figura 2). De uma forma geral, a morfologia das culturas clonais obtidas de pimenta longa (família *Piperaceae*) foi bastante similar entre si. As raízes foram eficientemente induzidas mediante a inoculação de explantes de pimenta longa com *A. rhizogenes*, e expressaram o fenótipo típico de raízes pilosas (*hairy-roots*).

Raízes transformadas de cenoura têm sido utilizadas para na obtenção de melhores estratégias de estudo, crescimento e produção de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) utilizando para transformação de raízes *A. rhizogenes*. Essa técnica tem

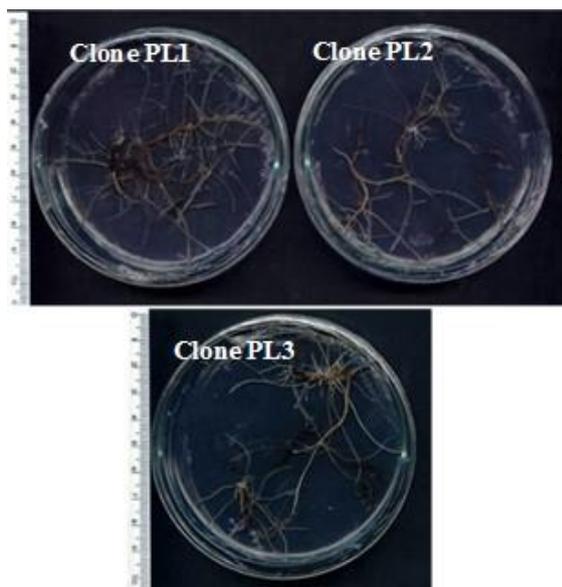


Figura 2. Clones de raízes transformadas (*hairy roots*) de pimenta longa, 120 dias após serem excisadas dos explantes (clones PL1, PL2 e PL3). Essas raízes foram obtidas a partir da inoculação de explantes de folha com a linhagem R1601 de *A. rhizogenes*.

possibilitado grandes avanços no conhecimento sobre multiplicação de FMA (COSTA et al., 2013).

Para a confirmação da transformação genética foi feita a extração do DNA de amostras das raízes inoculadas, plantas não inoculadas (controle negativo) e de plasmídeos purificados (controle positivo) contendo o gene marcador *npII* que codifica a enzima Neomicina fosfotransferase II - *npII*) (NYABOGA et al., 2014). A amplificação do fragmento do gene *npII*, nas amostras de raízes correspondentes, sugeriram a integração do T-DNA no genoma da pimenta longa (Figura 3).

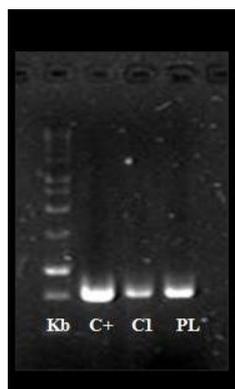


Figura 3. Análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do DNA de tecidos de pimenta longa, usando primers para o gene *npII*.

Legenda:

Kb Marcador de peso molecular.

C+ Plasmídeo com gene *nptII*.

C1 DNA genômico de pimenta longa não transformada.

PL Clone de pimenta longa transformado.

O gene *npII* é o gene marcador de seleção mais utilizado em transformação genética de plantas (BHATTACHARYYA et al., 2014 CHAKRABORTY et al., 2016). Ele codifica a enzima neomicina fosfotransferase II (*npII*), também chamada aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase II, que atua transferindo o grupamento γ fosfato do ATP para um grupo 3-hidroxil da porção amino-hexose dos antibióticos aminoglicosídeos, como a canamicina, a neomicina, a geneticina e a paromicina, que assim são detoxificados por fosforilação (NYABOGA et al., 2014). Na figura 3 pode ser observada a presença de bandas amplificadas para o controle positivo (plasmídeo contendo o gene *npII*) e para as amostras de raízes transformadas.

CONCLUSÕES

Houve um crescimento muito lento das plântulas obtidas de sementes de pimenta longa.

A inoculação por imersão de explantes foliares com a estirpe R1601 de *A. rhizogenes* permitiu a produção de raízes transformadas de Pimenta longa a partir de explantes foliares.

O ácido sinapínico não aumentou a infecção bacteriana e transformação gênica necessária à produção de raízes transformadas.

Foram obtidas culturas clonais das raízes transformadas, indicando potencial de uso para estudos de produção de metabólitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro recebido pelo CNPq e pela FAPERJ para realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

BHATTACHARYYA, A.; SOOD, P.; CITOVSKY, V. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular Plant Pathology*, v.11, n.5, p.705-719, 2010.

BHATTACHARYYA, N.; SINGH, H.R.; AGARWALA, N.; BHAGAWATI, P.; AHMED, G.; DAS, S. *Agrobacterium* mediated transfer of *npII* and *gus* genes in *Camellia assamica*. *Journal Agric. Biotechnol. Sustain. Dev.*, v.6, n.2, p.22-28. 2014.

BRAGA, N.P.; CREMASCO, M.A. Estudo da adsorção do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) em carvão ativado. *Scientia Amazônia*, v.5, p.75-81, 2016.

CHAKRABORTY, M.; REDDY, P.S.; NARASU, M.L.; KRISHNA, G.; RANA, D. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of commercially elite rice restorer line using nptII gene as a plant selection marker. *Physiol Mol Biol Plants*, v. 22, n. 1, p. 51–60, 2016.

COSTA, F.A.; HADDAD, L.S.M.; KASUYA, M.C.M.; OTONI, W.C.; COSTA, M.D.; BORGES, A.C. *In vitro* culture of *Gigaspora decipiens* and *Glomus clarum* in transformed roots of carrot: the influence of temperature and pH. *Acta Scientiarum Agronomy*, v.35, n.3, p.315-323, 2013.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3a. ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. p. 220.

FILOVA, A. Production of secondary metabolites in plant tissue cultures. *Research Journal of Agricultural Science*, v. 46, n. 1, p. 236-245, 2014.

FORTIN, C.; NESTER, E.W.; DION, P. Growth inhibition and loss of virulence in cultures of *Agrobacterium tumefaciens* treated with acetosyringone. *Journal of Bacteriology*, v.174, n.17, p.5676-5685, 1992.

GAI, Q.Y.; JIAO, J.; LUO, M.; WEI, Z.F.; ZU, Y.G.; MA, W.; FU, J.Y. 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, 2015.

GEORGIEV, M.I.; AGOSTINI, E.; LUDWIG-MÜLLER, J.; XU, J. Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends Biotechnol.*, v.30, p.528–537. 2012.

MARTIN, S.A. Disorders of primary metabolites in response to drought may increase the synthesis of natural products for medicinal purposes: South American herbs — a case study. *Recent Pat Biotechnol.*, v.8, n.1, p.36-46, 2014.

MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q.; SILVA, S.M.; RESENDE, R.F.; SILVA, A.S. Applications of tissue culture in medicinal plants. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.14, n.1, p.110-121, 2012.

NESTER, E.W. *Agrobacterium*: Nature's genetic engineer. *Frontiers in Plant Science*, v.5, 730, 2015.

NYABOGA, E.; TRIPATHI, J.N.; MANOHARAN, R.; TRIPATHI, L. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of yam (*Dioscorea rotundata*): an important tool for functional study of genes and crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, v.5, p.463. 2015.

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P.S.; MAAS, C.H.; REBELO, R.A.; GIOTTO, C.R.; WANDHAUSES J.R.; LARGURA, G.; TAVARES, L.B.B. *Biologia da Piper hispidinervum - Pimenta longa*. *Biologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília. v.15, p.18-23, 2000.

SOUZA-FILHO, A.P.S.; TREZZI, M.M.; IOUE, M.H. Sementes como fonte alternativa de substâncias químicas com atividade alelopática. *Planta daninha*, v.29, n.3, p.709-716, 2011.

SRINIVASAN, M.; KUMAR, K.; KUMUTHA, K.; MARIMUTHU, P. Influence of acetosyringone concentration on induction of carrot hairy root by *Agrobacterium rhizogenes*. *African journal of microbiology research*, v. 8, n.26, p.2486-2491, 2014.

STACHEL, S.E.; MESSENS, E.; MONTAGU, M.V.; ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, v.318, p.624-629, 1985.

SUBRAMONI, S.; NATHOO, N.; KLIMOV, E.; YUAN, Z.C. *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Frontiers in Plant Science*, v.8, p.322, 2014.

TIAN L. Using hairy roots for production of valuable plant secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v.149, p.275–324, 2015.

TOKI, S.; HARA, H.; ONO, K.; ONODERA, H.; TAGIRI, A.; OKA, S.; TANAKA, H. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *The Plant Journal*, v.47, p.969–976, 2006.

YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. *Plant Growth Regulation*, v.15, n.1, p.55-67, 1994.

ZHI, B.H.; ALFERMANN, A.W. Diterpenóide production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, v.32, n.3, p.699-703, 1993.