

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

DISSERTAÇÃO

**Produção de Raízes Transformadas por Infecção
com *Agrobacterium rhizogenes* em Diferentes
Espécies Vegetais**

José Nicomedes Júnior

2003



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PRODUÇÃO DE RAÍZES TRANSFORMADAS POR INFECÇÃO
COM *Agrobacterium rhizogenes* EM DIFERENTES ESPÉCIES
VEGETAIS**

JOSÉ NICOMEDES JÚNIOR

**Sob a Orientação da Professora
Sonia Regina de Souza**

Tese submetida como requisito
para obtenção do grau de **Magister
Scientiae** em Agronomia, Área de
Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ

633.4
N656p
T

Nicomedes Junior, José, 1978-
Produção de raízes transformadas por infecção com

Agrobacterium rhizogenes em diferentes espécies vegetais /

José Nicomedes Junior. - 2003.

56f. : il., graf., tab.

Orientador: Sonia Regina de Souza.

Dissertação(mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia.

Bibliografia: f. 48-54.

1. Raízes – Cultivo – Teses. 2. Plantas medicinais – Teses. 3. Matéria médica vegetal – Teses. I. Souza, Sonia Regina de. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Agronomia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO

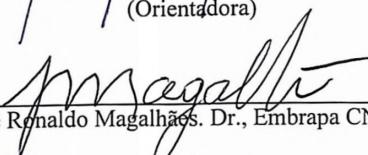
JOSÉ NICOMEDES JÚNIOR

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo, como requisito parcial para obtenção do grau de *Magister Scientiae* em Agronomia.

TESE APROVADA EM 19/02/2003



Sônia Regina de Souza. Dr., UFRRJ
(Orientadora)



José Ronaldo Magalhães. Dr., Embrapa CNPGL



Ricardo Luis Louro Berbara. Dr., UFRRJ

DEDICATÓRIA

Ao meu Deus, que me formou e me conhece desde o ventre de minha mãe. Que me ama, e morreu por mim. Que hoje é meu refúgio e salvação.

A meu pai, José Nicomedes, e minha mãe, Maria Izabel da Silva Nicomedes, que sempre torceram e investiram em mim.

Aos meus irmãos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu senhor, salvador e amigo Jesus Cristo, por ter me conduzido e ajudado até aqui. Por tantas promessas que se cumpriram em minha vida; pelo amor e cuidado a mim dedicado.

*"Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram o que Deus preparou para nós,
Um futuro certo, cheio de esperança e paz. Muita paz (...)
É tão bom sonhar teus sonhos, é tão bom viver seus planos,
E conhecer a graça de pertencer a Ti, Deus fiel
É tão bom fechar meus olhos e contemplar com minha fé
Todas as Tuas palavras, Tuas promessas para mim
Deus fiel."*

Ao meu pai pelo apoio e incentivo. Poucos acreditaram tanto no meu sucesso quanto você.

À minha mãe, a mulher mais forte, sensível e corajosa que já conheci (apesar de, às vezes, nem ela mesma perceber isto). Mãe, você foi e sempre será a minha maior incentivadora. Te amo!!!

À minha orientadora Professora Sonia Regina de Souza, pela essencial contribuição a esse trabalho, pois sem sua orientação e perseverança nunca teríamos alcançado os resultados aos quais chegamos. E também por ser referência de seriedade e profissionalismo, e um exemplo a ser seguido por todos que ainda acreditam na pesquisa e ensino público de qualidade.

Ao professor Ricardo Luis Louro Berbara pela proveitosa ajuda e orientação em todos os momentos.

A todos os membros formais e informais do meu comitê de orientação, José Ronaldo Magalhães, Mariam Lis Stark, professor Manlio Silvestre Fernandes e Ana Cristina Portugal, que com opiniões e críticas me ajudaram na construção desse trabalho. Ao professor Wagner Otoni e a todos da UFV que me receberam com tanta hospitalidade, e contribuíram tanto para a finalização deste trabalho.

À professora Rosane Nora Castro, pela parceria e ajuda.

A todos que trabalham no PQ, em especial a Conceição pelo carinho e amizade com que me tratou todos esses anos.

À professora Lúcia Helena C. dos Anjos, coordenadora do curso, e ao Nilson e à Luciene, por terem sido grandes cooperadores.

À UFRuralRJ e às agências governamentais que me disponibilizaram bolsas de estudo. Isso mostra a valorização do esforço e dedicação daqueles que se esmeraram na realização de pesquisa de qualidade.

Aos meus irmãos, Cleiton e Cleverson. Vocês são muito importantes para mim. À minha irmã Débora, por ser a pessoa que é. Você não imagina o quanto eu te amo. Aos meus sobrinhos Clevinho e Maria Fernanda, que são fontes inesgotáveis de alegria. Às cunhadas Luciana e Patrícia.

À Juliana, por me amar tanto. Pode ter certeza que durante toda minha a vida procurarei retribuir o bem que você me faz.

À minha tia Débora, segunda mãe.

Aos meus amigos, que são tantos, mas inesquecíveis.

Aos irmãos da PIB-Itatiaia: Aline, Raquel, Ricardo, Marco Antônio, Marcos Estevo e à família destes e também todos os outros irmãos da minha amada igreja. Muito obrigado pelas orações dedicadas a mim. Ao amado Pastor Anderson e à sua família, grande amigo que acompanhou cada passo da minha carreira com o entusiasmo de um irmão mais velho.

Aos eternos companheiros da turma 96/I e agregados, Danizinha, Rejane, Carol, Salomão, Elida, Aline e Dartanhã, Wilson, Denis, Patrícia, Viviane, Claudemar, Márcio.

Aos meus amigos mais chegados que irmãos da ABUB e Didaquê, Josimar, Marquinhos, Luilson, Carol, Siliane, Fernanda, André, Flávio, dentre outros.

Aos amigos que trabalharam comigo no laboratório (uma verdadeira, fiel e competente equipe), Fabiana, Bruno Guimarães, Claryssa, Luíza, Fabíola, Leonardo (Bob's), Virgínia, Guto, Ana Carolina. E a todos os outros que trabalham em outros projetos, mas que de alguma forma me ajudaram, nem que seja com sorrisos ou um 'bom dia' carinhoso: Aline (Bôlinha), Cris, Rejane, Lucas e Marco André, Matheus, Thayanne e Aline e ao pessoal do Laboratório de Nutrição de Plantas.

Aos amigos e família do quarto 326: Bruno Pena, Luciano, Júlio, Rodolfo, Fernando, Fernanda, Pablo. Bruno (Nino), irmão, obrigado por tudo, a você e sua família.

Aos amigos e alunos dos cursos pré-vestibular, Miguel e família, Rosendo, Alexandre (RO), dentre muitos outros.

A todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração desse trabalho,

MUITO OBRIGADO.

BIOGRAFIA

Este trabalho foi realizado por José Nicomedes Júnior, que nasceu em Petrópolis-RJ, no dia 04 de outubro de 1978, filho de José Nicomedes (de quem herdou o nome e o exemplo) e Maria Izabel da Silva Nicomedes (de quem herdou muito amor). O parto já havia sido previamente marcado para o dia 12 de outubro, mas foi realizado com urgência oito dias antes devido a “deslocamento de placenta”. Segundo sua mãe, o nascimento foi fruto do amor e misericórdia de Deus, pois tudo indicava que não iria dar certo.

Júnior (como é chamado pela família) sempre estudou em escolas públicas, com ensino precário e deficiente. Mas conseguiu (por esforço próprio, sim, mas principalmente por intermédio de Deus) entrar na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no primeiro semestre de 1996. Fez grandes e inesquecíveis amigos (muitos), mas também estudou bastante. Em 1997 foi contemplado com uma bolsa de iniciação científica do CNPq, e no ano seguinte renovou sua bolsa, então já orientado pela Profa. Sonia Regina de Souza, que o acompanharia na caminhada até o mestrado.

Diplomado em Engenharia Agronômica em 23 de fevereiro de 2001, entrou no Curso de Pós-graduação em Agronomia – Ciência do Solo, na mesma universidade onde se graduou. Bolsista da CAPES no primeiro ano de curso, foi contemplado com uma Bolsa para alunos Nota 10 no segundo ano, num programa da FAPERJ.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	O Gênero <i>Agrobacterium</i> sp.	3
2.2	Interação Agrobactéria-Hospedeiro	3
2.3	Infecção Bacteriana – O Papel da Região vir.....	5
2.4	A Formação das Raízes Transformadas	5
2.5	Metabolismo Especial – Plantas como Fonte de Matéria-prima para Indústria Química	6
2.6	Metabólitos Especiais Encontrados em Raízes	7
2.7	Cultivo <i>in vitro</i> de Células, Tecidos e Órgãos Vegetais	7
2.8	Cultura de Raízes Transformadas e Produção de Metabólitos Especiais	8
2.9	Espécies Vegetais Estudadas	11
3	MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1	Inoculação de Plantas Inteiras de Diferentes Espécies Vegetais em Vasos com <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	13
3.2	Inoculação de Explantes Vegetais Obtidos de Plantas de <i>Ocimum basilicum</i> Cultivadas em Vasos com Linhagens Selvagens de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	14
3.3	Inoculação de Explantes Vegetais Obtidos de Plantas Cultivadas <i>in vitro</i> com Linhagens Selvagens de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	15
3.3.1	Inoculação de manjericão-roxo var. Dark Opal e manjericão-verde var. Minete Anão com as linhagens A4, LBA e 8196 de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	15
3.3.2	Inoculação de explantes de aneto, lavanda e hissopo com as linhagens A4, LBA, 8196 e 17242 de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	17
3.4	Inoculação de Explantes Vegetais com a Estirpe R1601 de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	19
3.4.1	Inoculação de explantes de folha e segmentos de caule de hissopo com a estirpe R1601 de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	19
3.4.2	Inoculação de explantes de folha de manjericão-roxo var. Dark Opal e manjericão-verde var. Minete Anão com a estirpe R1601 de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	20

3.4.3	Inoculação de explantes de folha de pimenta-longa com e sem ácido sinapínico com a estirpe R1601 de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	21
3.5	Caracterização da Transformação Genética.....	23
3.6	Análise Qualitativa de Safrol.....	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO 25	
4.1	Inoculação de Plantas Inteiras em Vasos.....	25
4.2	Inoculação em Explantes Vegetais Obtidos de Plantas Cultivadas em Vasos	25
4.3	Inoculação de Explantes Vegetais Obtidos de Plantas Cultivadas <i>in vitro</i> com Linhagens Selvagens de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>.	25
4.3.1	Inoculação de Diferentes Explantes de Manjericão-roxo e Manjericão-verde com as Linhagens A4, LBA e 8196 de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	26
4.3.2	Inoculação de Explantes de Aneto, Lavanda e Hissopo com as Linhagens A4, LBA, 8196 e 17242 de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	28
4.4	Inoculação com a Estirpe R1601 de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>.....	30
4.4.1	Inoculação de Explantes de Folha e Segmentos de Caule de Hissopo.	30
4.4.2	Estabelecimento e Culturas Clonais de Raízes Geneticamente Transformadas de Hissopo.....	31
4.4.3	Inoculação de Explantes de Manjericão-roxo var. Dark Opal e Manjericão-verde var. Minete Anão.	32
4.4.4	Estabelecimento e Culturas Clonais de Raízes Geneticamente Transformadas de Manjericão-roxo var. Dark Opal e Manjericão-verde var. Minete Anão....	35
4.4.5	Inoculação de explantes de pimenta-longa com a estirpe R1601 de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> com e sem ácido sinapínico.....	39
4.4.6	Estabelecimento e Culturas Clonais de Raízes Geneticamente Transformadas de Pimenta Longa.	40
4.5	Caracterização de Transformação Gênica	42
4.6	Análise Qualitativa de Safrol.....	44
5	CONCLUSÃO 45	
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS 46	
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 48	

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema da organização estrutural de um plasmídio pRi. A região 'vir' é a região de virulência; região 'ori + inc' é a região de origem de replicação e a região de incompatibilidade; região 'opc' é a região de catabolismo de opinas; região 'tra' é a responsável pela transferência conjugativa do plasmídio; as regiões de 25 pares de base delimitam a região-T. Essa região corresponde ao T-DNA, onde estão os genes que induzem o crescimento de raízes, assim como os genes que codificam para síntese das opinas nos tecidos vegetais. Adaptado de SLUYS, 1999..... 4
- Figura 2 (A) calos de aneto, 50 dias após serem retirados dos explantes. Esses calos foram obtidos a partir da inoculação de explantes de folha com a linhagem 8196 de *Agrobacterium rhizogenes*. (B) calos de hissopo, 50 dias após serem retirados dos explantes. Esses calos foram obtidos a partir da inoculação de explantes de folha com a linhagem LBA de *Agrobacterium rhizogenes*..... 29
- Figura 3: Raízes obtidas a partir de plantas de hissopo (*Hyssopus officinalis*) infectadas com *Agrobacterium rhizogenes* (R1601), 20 dias após inoculação..... 30
- Figura 4 (A) Explantes de folhas de Hissopo inoculados com *Agrobacterium rhizogenes* (R1601). (B) Controle: explantes de folhas de Hissopo sem inoculação. 31
- Figura 5 Culturas de raízes de hissopo, 37 dias após serem retiradas dos explantes (clones H1, H2, H3 e H4). Essas raízes foram obtidas a partir da inoculação de explantes de folha com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*. 32
- Figura 6 Explantes de manjericão-roxo inoculados com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes* (placas a esquerda) e explantes de manjericão-roxo não inoculados (placas a direita), 20 dias após a inoculação..... 33
- Figura 7 Explantes de manjericão-verde var. Minete Anão inoculados com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes* (placas a direita) e explantes de manjericão-roxo não inoculados (placas a esquerda). 34
- Figura 8 Culturas de raízes de manjericão-roxo var. Dark Opal, 37 dias após serem excisadas dos explantes (clones MR1, MR2, MR4, MR5, MR6 e MR7). Essas raízes foram obtidas a partir da inoculação de explantes de folha com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*. 36
- Figura 9 Culturas de raízes de manjericão-roxo var. Dark Opal, 37 dias após serem excisadas dos explantes (clones MR8 e MR9). Essas raízes foram obtidas a partir da inoculação de explantes de folha com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*. 37
- Figura 10 Culturas de raízes de manjericão-verde var. Minete Anão, 37 dias após serem excisadas dos explantes (clones MV1, MV2, MV3, MV4, MV5 e MV6). Essas raízes foram obtidas a partir da inoculação de explantes de folha com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*. 38
- Figura 11 Número de explantes de folha de pimenta longa que produziram raízes quando inoculadas com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*, na presença ou ausência de 20 μ M de ácido sinapínico, 50 dias após inoculação. 40

Figura 12 Culturas de raízes 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 *Agrobacterium rhizogenes* 41

Figura 13 Análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do DNA de tecidos de manjericão-roxo var. Dark Opal, manjericão-verde, var. Minete Anão, hissopo e pimenta longa, usando primers para o gene *nptII* 43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Algumas espécies transformadas por <i>Agrobacterium rhizogenes</i> utilizadas para produção <i>in vitro</i> de seus metabólitos secundários.....	10
Tabela 2 Esquema de montagem do experimento para inoculação de <i>Ocimum basilicum</i> com <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	15
Tabela 3 Esquema de montagem do experimento para inoculação de duas variedades de manjericão com três linhagens selvagens de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	17
Tabela 4 Esquema de montagem do experimento para inoculação de aneto, lavanda e hissopo com três diferentes linhagens selvagens de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	18
Tabela 5 Respostas morfogenéticas apresentadas por explantes de folha e segmentos de caule de manjericão-verde var. Minete Anão, 20 dias após inoculação com diferentes linhagens selvagens de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (30 explantes / linhagem de bactéria).....	26
Tabela 6 Respostas morfogenéticas apresentadas por explantes de folha e segmentos de caule de manjericão-roxo var. Dark Opal, 20 dias após inoculação com diferentes linhagens selvagens de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (30 explantes / linhagem de bactéria)	26
Tabela 7 Respostas morfogenéticas apresentadas por explantes de segmentos de caule de aneto, 20 dias após inoculação com diferentes linhagens selvagens de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	28
Tabela 8 Respostas morfogenéticas apresentadas por explantes de segmentos de caule de lavanda, 20 dias após inoculação com diferentes linhagens selvagens de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	30

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 Esquema dos ciclos para a reação de polimerase em cadeia (PCR) para amplificação de gene neomicina fosfotransfersase (nptII)	23
---	----

RESUMO

NICOMEDES JÚNIOR, José. **Produção de raízes transformadas geneticamente por infecção com *Agrobacterium rhizogenes* em diferentes espécies vegetais.** Seropédica: UFRRJ, 2002. 56p. (Dissertação, Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo).

Este trabalho teve por objetivo a obtenção de raízes transformadas de espécies medicinais, conhecidas por produzirem algum tipo de metabólito especial, e já utilizadas com fins terapêuticos ou industriais. As raízes foram obtidas a partir da infecção das plantas com diferentes estirpes da bactéria *Agrobacterium rhizogenes*. As espécies vegetais utilizadas foram *Hissopus officinalis* (hissopo), *Anethum graveolens* (aneto), *Piper hispidinervium* (pimenta-longa) e *Ocimum basilicum* (manjericão). Sementes dessas plantas foram esterilizadas e germinadas em condições assépticas, e as plântulas obtidas foram inoculadas por diferentes linhagens de *Agrobacterium rhizogenes* (LBA, 8196, A4 e R1601). Foram avaliados os efeitos de diferentes métodos de inoculação e também a interação de cada linhagem de bactéria utilizada com as espécies vegetais na produção de raízes e calos transformados. Das raízes e dos calos produzidos foram feitos sub-cultivos. Os resultados mostram que o método mais eficiente para a inoculação é o baseado na imersão dos explantes em meio de cultura líquido, com a bactéria em crescimento, pois apresenta maior praticidade, menor índice de contaminação, maior taxa de infecção e o que causa menos danos aos explantes. Diferentes respostas morfogenéticas foram obtidas a partir de explantes inoculados com diferentes linhagens de *Agrobacterium rhizogenes*. Para manjericão, duas variedades (manjericão-roxo Dark Opal e manjericão-verde folha fina) foram inoculadas com as linhagens LBA, A4 e 8196 da bactéria. Foram utilizados dois explantes, segmentos de caule e folhas. A inoculação com as linhagens LBA e 8196 de *Agrobacterium* possibilitou redução no número de explantes de folha de manjericão-verde oxidados em relação ao controle e aqueles inoculados pela linhagem A4. Para manjericão-roxo, foi observado formação de raiz, sem formação de calo em 73,7% dos explantes de folha inoculados com a linhagem LBA. Para os explantes inoculados com linhagem 8196 observou-se formação indireta de raízes, ou seja, as raízes surgem após a formação de calos. Explantes controle, não inoculados, de ambas as variedades de manjericão produziram raízes. Esses dados mostram que as linhagens de *Agrobacterium* interagem de maneira distinta com as variedades de manjericão utilizadas, fornecendo respostas morfogenéticas diferenciadas. Explantes de folha de aneto e hissopo, ao serem inoculados com as linhagens LBA e 8196 também apresentaram variação nas respostas morfogenéticas. Explantes de aneto inoculados com a linhagem 8196 apresentaram formação de massas de calos, enquanto que explantes inoculados com a linhagem LBA e explantes controle não formaram calos ou raízes. Para hissopo, a linhagem 8196 induziu à formação de calos, enquanto que os explantes inoculados com LBA e os explantes controle oxidaram sem apresentar nenhuma resposta. Esses calos produzidos apresentaram elevada taxa de crescimento nos sub-cultivos feitos em meio de cultura livre de hormônios. Explantes de folha de hissopo, manjericão e pimenta-longa, inoculados com a estirpe R1601, formaram raízes que apresentaram crescimento nos sub-cultivos subseqüentes.

Palavras-chave: Plantas medicinais, cultura de raízes.

ABSTRACT

NICOMEDES JÚNIOR, José. **Production of transformed roots by *Agrobacterium rhizogenes* infection in different plant species.** Seropédica: UFRJ, 2002. 56p. (Dissertation, Master Science in Agronomy, Soil Science).

The objective of this research was to obtain transformed roots (hairy roots) from medicinal plants, known for production of some type of special metabolite, and already used therapeutically and industrially. The roots were obtained by plant infection with different strains of the bacteria *Agrobacterium rhizogenes*. The plant species used were *Hyssopus officinalis* (hyssop), *Anethum graveolens* (dill), *Piper hispidinervium* (long pepper) and *Ocimum basilicum* (basil). Seeds from these plants were sterilized and germinated in aseptic conditions, and the seedlings were inoculated with different strains of *Agrobacterium rhizogenes* (LBA, 8196, A4 e R1601). The effects of different inoculation methods and also interaction of each bacteria strain used with the different vegetable species in production of transformed roots and calluses were evaluated. Subcultures were made from the resulting roots and calluses. Results showed that the most efficient method for explant inoculation was based in immersion of them in a liquid culture medium containing growing bacteria. It was more practical, showed less contamination, higher infection rate and it was less hazardous to the explants. Different morfogenetic responses were obtained from explants inoculated with different strains of *Agrobacterium rhizogenes*. For basil, two varieties (Dark Opal and Minete Anão) were inoculated with bacteria strains (LBA, A4 and 8196). Two explants, leaf and stem sections were used. The inoculation with *Agrobacterium* strains LBA and 8196 reduced number of oxidated leaves explants, compared to control and A4 strain, in basil Dark Opal. To basil var. Dark Opal, root growing was observed, although growth of calluses was not observed in 73,7% of leaf explants inoculated with strain 8196. Control explants (not inoculated) from both basil varieties produced roots. This data shows that the *Agrobacterium rhizogenes* strain interacts differently with basil varieties, providing different morfogenetic responses. Dill and hyssop leaf explants, when inoculated with LBA and 8196 strains, also provided different morfogenetic responses. Dill explants inoculated with 8196 strain presented masses of callus formation, whereas explants inoculated with LBA strain and control explants did produce neither calluses nor roots. To hyssop, the strain 8196 induced calluses formation, whereas explants inoculated with LBA and control explants oxidated without providing any response. These resulting calluses had high growth rate in sub-cultures made in culture medium, hormone-free. Leaf explants of hyssop, dill, basil and long pepper inoculated with R1601 strain, produced roots which presented growth in following sub-cultures.

Key words: Medicinal plants, root cultures.

1 INTRODUÇÃO

Os trópicos detêm as maiores reservas de plantas com potencial de produção de metabólitos especiais do Planeta. Entretanto, a perda indiscriminada destes vegetais pode contribuir para sua extinção. Nestas regiões, a biodiversidade é importante, não apenas devido ao seu aspecto ecológico, mas também como uma fonte de substâncias naturais bioativas (ELISABTSKY & WANNMACHER, 1993). Supõe-se que no Brasil ocorram entre 60 e 250 mil espécies vegetais e que, provavelmente, 40% delas contenham propriedades terapêuticas (GOTTLIEB, 1982; GOTTLIEB e KAPLAN, 1993). Com um potencial tão grande, e em grande parte inexplicado, é de extrema relevância que se procure reverter esse quadro. Com isso, estudos sobre a ecofisiologia destas espécies e a influência dos fatores ambientais na produção dos metabólitos especiais são de grande importância.

De todas as partes da planta, a raiz é a menos estudada. Tal fato é surpreendente uma vez que raízes são excelentes sintetizadoras de produtos fitoquímicos (FLORES & CURTIS, 1992; FLORES et al., 1999; KUZOVKINA, 1992). O uso de raízes na produção de remédios, corantes, agroquímicos, e fragrâncias entre outras, é reconhecido há milhares de anos, conforme indica a farmacopéia japonesa e chinesa (FARNSWORTH, 1988).

O estudo em raízes é limitado devido ao manuseio laborioso dessa parte do vegetal em condições controladas. Porém, essa limitação pode ser suplantada com o uso de culturas de raízes transformadas ("hairy roots"), produzidas por espécies vegetais infectadas pela bactéria *Agrobacterium rhizogenes*, que ao infectar a planta transfere parte de seu DNA plasmidial para ela. Uma vez integrado ao genoma vegetal, o T-DNA (região transferida) é transcrita e produz enzimas responsáveis pela síntese de hormônios e opinas. As opinas são utilizadas pelas agrobactérias como fonte de energia, enquanto que os hormônios produzidos provocam um desbalanço no metabolismo das células vegetais, que passam agora a se propagar desordenadamente, induzindo a formação de raízes. Essas culturas de raízes transgênicas apresentam taxas de crescimento superiores àquelas observadas em raízes não transformadas e, ao mesmo tempo, expressam metabólitos secundários estáveis, tais como alcalóides, poliacetilenos, sesquiterpenos e naphthoquinonas, entre outros (FLORES et al., 1994). Os trabalhos desenvolvidos com culturas de raízes transformadas geneticamente reportam que os níveis e o espectro dos metabólitos secundários produzidos assemelham-se, em muito, àqueles produzidos por raízes de plantas intactas (FLORES et al., 1999).

O estudo com raízes transformadas ("hairy roots") possibilita a produção, em condições controladas, de metabólitos especiais bioativos, levando à preservação das espécies vegetais, ao mesmo tempo em que se emprega a tecnologia da recombinação genética, criando raízes transgênicas que produzirão, assim, metabólitos secundários em um sistema fechado. Nestas condições o risco de contaminação diminui, pois deixa de existir liberação ao meio ambiente de plantas geneticamente modificadas, uma vez que raízes transgênicas não apresentam estrutura de reprodução e apenas sobrevivem em ambiente controlado (bioreatores, placas de Petri, etc.).

A produção de substâncias por plantas é particularmente interessante, se for possível o uso de uma parte do vegetal que se propague, de maneira continuada, *in vitro*, sem a necessidade de reguladores de crescimento que possam interferir com o

metabolismo vegetal. Este propósito torna-se possível através do uso de raízes transformadas geneticamente ("hairy root"). Estas raízes cultivadas *in vitro* se constituem em fonte potencial de substâncias bioativas, que podem ser utilizadas com fins terapêuticos e industriais. A utilização de cultura de raízes prescinde da propagação da planta inteira e permite também que espécies vegetais normalmente utilizadas para a extração de substâncias bioativas, possam ser preservadas do extrativismo.

O objetivo do presente trabalho foi a produção de raízes transformadas de espécies medicinais, conhecidas por produzirem algum tipo de metabólito especial, e já utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam de interesse industrial. As raízes foram produzidas a partir da infecção das plantas com linhagens distintas da bactéria de solos *Agrobacterium rhizogenes*, utilizando-se diferentes métodos de inoculação.

As plantas utilizadas foram *Piper hispidinervium* (Pimenta-longa); *Ocimum basilicum* (Manjericão-roxo); *Hissopus officinalis* (Hissopo) e *Anetum graveolens* (Aneto). Para a infecção bacteriana foram usadas as seguintes linhagens de *Agrobacterium rhizogenes*: A4, 8196, LBA, 17242 e R1601.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Gênero *Agrobacterium* sp.

Os primeiros organismos superiores geneticamente transformados obtidos pelo homem foram plantas de fumo, criadas em 1973, onde *Agrobacterium rhizogenes* foi usada como vetor de transformação (ACKEMANN, 1977).

O gênero *Agrobacterium* (do grego *agros* = campo e *bakterion* = bastonete) engloba cinco espécies, sendo as de maior importância *Agrobacterium tumefaciens*, agente etiológico da doença galha-da-coroa, e *Agrobacterium rhizogenes*, causadora da raiz em cabeleira (do inglês “hairy root”) (DE CLEENE & DE LEY, 1981). Estes microrganismos são bactérias típicas de solo, do tipo bacilo aeróbico, gram-negativo (BRASILEIRO, 1998).

As doenças provocadas pela infecção com agrobactérias despertaram interesse de inúmeros pesquisadores no início do século passado, quando se desvendou o processo que desencadeia a formação de tumores na região da coroa (junção entre o caule e a raiz) ou de raízes em profusão nas plantas. Descobriu-se que o processo é resultado de uma transferência natural de genes da bactéria para a célula vegetal. As células vegetais transformadas passam a sintetizar substâncias que estimulam a divisão celular no sítio de infecção, e adquirem a capacidade de multiplicação e crescimento em meio de cultura sem adição de hormônios e reguladores, quando excisados das plantas e na ausência da bactéria (DESSAUX et al., 1993).

O sistema foi adaptado para uso na engenharia genética, tornando a transferência de genes de células procarióticas para células eucarióticas uma realidade. As agrobactérias se tornaram vetores de transformação, tendo sido estabelecido que os genes contidos no T-DNA em nada interferiam em sua transferência da célula bacteriana para a célula vegetal. Construíram-se os chamados vetores ‘desarmados’ das funções oncogênicas, ou seja, foram retirados os genes que codificam a síntese dos hormônios auxina e citocinina (ZAMBRYSKY et al., 1983).

2.2 Intereração Agrobactéria-Hospedeiro

O mecanismo de transferência dos genes é muito similar para as duas espécies de *Agrobacterium* e está diretamente ligado a existência de um plasmídio de alto peso molecular Ti (do inglês *Tumor inducing*) ou Ri (*Root inducing*), presente em todas as linhagens patogênicas de *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*, respectivamente. Esse plasmídio se divide em regiões distintas (figura 1), sendo a região T-DNA (do inglês *transferred DNA*) a porção que é efetivamente transferida para a célula vegetal. Essa região é limitada por duas seqüências repetidas de 25 pb, conhecidas como extremidades esquerda e direita. O T-DNA é integrado ao genoma das células vegetais de forma estável, carregando genes da bactéria, mas com seqüências regulatórias eucarióticas, que permitem sua expressão nas células vegetais infectadas (GIRI & NARASU, 2000).

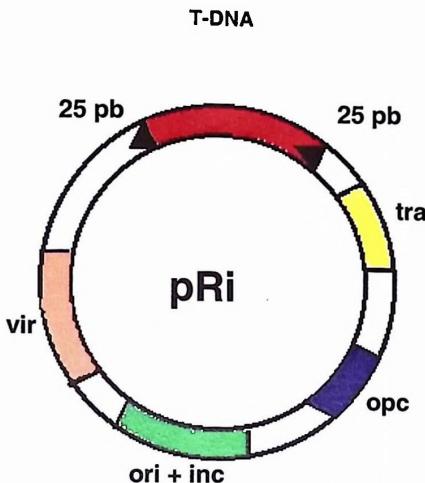


Figura 1: Esquema da organização estrutural de um plasmídio pRi. A região 'vir' é a região de virulência; região 'ori + inc' é a região de origem de replicação e a região de incompatibilidade; região 'opc' é a região de catabolismo de opinas; região 'tra' é a responsável pela transferência conjugativa do plasmídio; as regiões de 25 pares de base delimitam a região-T. Essa região corresponde ao T-DNA, onde estão os genes que induzem o crescimento de raízes, assim como os genes que codificam para síntese das opinas nos tecidos vegetais. Adaptado de SLUYS, 1999.

Uma vez no genoma vegetal, os genes contidos no T-DNA (oncogenes) são expressos, codificando a síntese de enzimas envolvidas na via de biossíntese de hormônios vegetais, como citocininas e auxinas (BRASILEIRO e LACORTE, 1998), que levam à proliferação desordenada das células e geração dos tumores ou raízes em cabeleira. Outros genes contidos nessa região codificam para síntese de substâncias conhecidas por opinas, que são uma classe única de moléculas produzidas em células vegetais, a partir de metabólitos vegetais, sob o controle de genes de origem bacteriana e para uso exclusivo no metabolismo das células do patógeno (DESSAUX et al., 1993).

Outra região de grande importância do plasmídio Ti ou Ri é a região *vir* (*virulence*), que possui genes que codificam proteínas responsáveis pela retirada da região T-DNA da célula bacteriana e transferência desta fita de DNA para o genoma vegetal, mediando a transformação (OKSMAN-CALDENTEY e HILTUNEN, 1996).

Para que se inicie o processo de infecção de uma planta por *Agrobacterium* se faz necessário que a célula bacteriana entre em contato com o tecido vegetal, e isso é possível por meio de lesões naturais (injúrias mecânicas causadas por ataque de insetos ou geadas, por exemplo) ou induzidas. As células lesadas exsudam substâncias que funcionam como moléculas-sinal, atraindo as bactérias (quimiotactismo positivo). Várias moléculas químicas, dentre compostos fenólicos, chalconas, ácidos cinâmicos, açúcares e aminoácidos têm sido relatadas como sinalizadoras nesse processo de infecção. Como exemplo podem ser citados compostos precursores da lignina (SPENCERS & TOWERS, 1988), a acetosiringona (DELMOTTE et al., 1991 e HU &

ALFERMANN, 1993), acetovanilona, ácido sinapínico e derivados do ácido siríngico (STACHEL et al., 1985). Muitos desses compostos, quando adicionados ao meio de cultura para crescimento das agrobactérias, aumentam a taxa de infecção dos explantes vegetais (JOUBERT et al., 2002 e HU & ALFERMANN, 1993).

Uma vez em contato com as células vegetais, as células bacterianas sintetizam microfibrilas de celulose, que lhe propiciam melhor fixação (BRASILEIRO & LACORTE, 1998), e dão início ao processo de infecção.

2.3 Infecção Bacteriana – O Papel da Região *vir*

Segundo HERRERA-ESTRELLA et al. (1993) a região T-DNA não contribui para o processo de transferência, uma vez que um gene exógeno pode ser introduzido na região-T e mesmo assim, ser passado para a célula vegetal. A região responsável pelo processo de transferência é a região *vir* (virulência). Essa região é a que efetivamente é induzida pela presença de tecidos vegetais lesados expressando genes que permitirão a transferência da região-T para dentro do núcleo da célula vegetal (SLUIZ, 1999). Essa região funciona como um regulon, com sete grupos de complementação (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, *virH*).

A região *vir* é um regulon constituído por diversos operons. O processo de indução e transferência da fita-T é controlado pela expressão coordenada da região *vir*. O *locus virA* codifica para uma proteína de membrana que percebe a presença dos metabólitos da planta injuriada. As proteínas *VirA* e *VirG* são expressas constitutivamente, sendo as reguladoras positivas dos outros genes *vir*. Acredita-se que a interação entre a proteína *VirA* e *VirG* ocorra por meio da fosforilação de *VirG* mediante uma função quinase de *VirA*. A proteína *VirG* fosforilada é a responsável pela indução da transcrição de toda região *vir* (SHENG & CITOVSKY, 1996).

Para formar a fita-T, o operon *virD* codifica endonucleases capazes de reconhecer e clivar dentro dos 25 pares de base que delimitam a região-T (SLUYS, 1999).

As proteínas *VirD2* e *VirE2* protegem a fita-T durante a transferência, feita na forma de fita simples. A *VirD2* protege a extremidade 5' e a proteína *Vir E2* faz proteção ao longo da fita, impedindo o enrolamento da fita.

Proteínas codificadas pelo *locus virB* seriam as responsáveis pela passagem da fita-T pela membrana bacteriana, formando um poro para a passagem do complexo fita T e moléculas associadas através das membranas e parede celular (ZAMBRYSKY, 1992).

Após a sua chegada ao núcleo, pouco se conhece sobre o processo efetivo da integração da fita-T no DNA nuclear das células hospedeiras.

2.4 A Formação das Raízes Transformadas

O mecanismo envolvido no aparecimento de tumores, no caso da infecção por *Agrobacterium tumefaciens*, e o mecanismo envolvido no aparecimento de raízes, no caso da infecção por *Agrobacterium rhizogenes*, são distintos. O processo envolvendo o surgimento das raízes em cabeleira é mais complexo e pouco compreendido (SLUYS, 1999).

No caso da formação dos tumores, o crescimento do tecido é decorrente de um aumento nas quantidades de auxina e citocinina endógena, gerada pela “síntese de novo” dessas substâncias nas células transformadas. A auxina é gerada na forma de

ácido indolacético, e os genes que codificam sua síntese são *iaaH* e o *iaaM*. (INZÉ et al., 1984).

Já o surgimento das raízes, mostra forte correlação entre o nível endógeno de auxinas nos tecidos e o desenvolvimento das raízes transformadas (CARDARELLI et al., 1987). Segundo CAPONE et al. (1989) foram verificados que três *loci* independentes no T-DNA de *Agrobacterium rhizogenes* são capazes de induzir a formação de raízes nos tecidos infectados. São eles *rolA*, *rolB* e *rolC* ('root' *loci*). Os produtos gênicos destes são ainda pouco conhecidos. Estes autores mostram que as células infectadas por *Agrobacterium rhizogenes* são mais sensíveis à auxina, mas não se observa o aumento na quantidade de auxinas nesses tecidos.

Ainda não se estabeleceu um modelo para o desenvolvimento de "hairy roots" nos tecidos vegetais, sabendo-se apenas da maior sensibilidade das células infectadas à auxina endógena. Mas, genes *aux* já foram identificados em *Agrobacterium rhizogenes*, parecendo funcionar como uma fonte adicional de auxinas (MOYANO et al., 1999). Porém, a presença desses genes nas células transformadas confere a formação de 'hairy roots' com aspecto de calo, levando à desorganização dos tecidos, devido ao excesso de auxina.

Segundo VAN SLUIZ & TEMPÉ, 1989, as raízes são clonais, ou seja, cada raiz transformada é originada de uma célula transformada.

2.5 Metabolismo Especial – Plantas como Fonte de Matéria-prima para Indústria Química

Os produtos do metabolismo especial, ou também chamado de secundário são compostos químicos, de grande variabilidade e baixo peso molecular, produzidos e acumulados, geralmente em pequenas quantidades, nos tecidos vegetais. Muitas espécies vegetais apresentam compostos fenólicos e terpenóides em abundância, e mais de um terço das espécies contém algum tipo de composto nitrogenado, tais como glicosídeos cianogênicos e alcalóides (HARBORNE, 1997).

A importância ecológica desses compostos é grande, uma vez que estes são responsáveis pela interação das plantas entre si, e com outros seres vivos. São de fundamental importância nos processos de reprodução, na polinização e dispersão de frutos e sementes, bem como na defesa dos vegetais contra ataques de herbívoros em geral (CRAWLEY, 1997).

O metabolismo secundário vegetal é regulado pela disponibilidade de precursores primários, que também são necessários para sustentar a respiração e crescimento das plantas. Assim, as condições ambientais exercem grande influência na produção destes compostos, uma vez que modulam a taxa de fotossíntese e de aquisição de nutrientes pelas plantas.

Desta vasta gama de compostos produzidos pelas plantas, a partir do metabolismo especial, muitos apresentam atividade biológica. Um composto é biologicamente ativo quando exerce uma ação específica sobre um determinado ser vivo, seja ele animal, vegetal ou microrganismo. Podem apresentar ação tranquilizante, analgésica, antiinflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana (SANTOS et al, 1999 e NICOMEDES et al, 2000), antiviral (GOLLAPUDI, 1995), fungicida (NICOMEDES et al, 2001), repelência a insetos ou inseticida, etc. Estes compostos são usados para as mais diversas finalidades, tanto na terapêutica médica, para prevenir ou curar doenças, como na indústria de cosméticos e de alimentos, servindo como aromatizantes, flavorizantes ou antioxidantes (PLETSCH, 2001).

Atualmente, mais de 25% dos medicamentos produzidos contém um ou mais ingredientes ativos de origem natural (OKSMAN-CALDENTEY & HILTUNEN, 1996). Esses produtos atingem elevado preço no mercado, e movimentam cerca de 10 bilhões de dólares só nos Estados Unidos (PRINCIPE, 1989). A síntese total ou parcial de muitos desses compostos em laboratório nem sempre é possível, e quando é possível, geralmente não é viável economicamente. Por isso, esses compostos são, normalmente, isolados de plantas cultivadas, que exigem condições ambientais específicas, clima especial, além de tratos culturais laboriosos, nem sempre viáveis.

Métodos alternativos para a produção desses compostos têm sido estudados (OKSMAN-CALDENTEY & HILTUNEN, 1996), e a cultura de tecidos e órgãos vegetais têm sido uma ferramenta de grande funcionalidade nesse processo. Com o objetivo de aumentar os valores de produtividade de compostos bioativos em sistemas de cultura de tecidos vegetais, a elucidação de vias biossintéticas e a aplicação de técnicas de biologia molecular, culturas de suspensões celulares, calos e raízes modificadas geneticamente têm demonstrado grande potencial para produção industrial. (GIRI & NARASU, 2000).

2.6 Metabólitos Especiais Encontrados em Raízes

Raízes de plantas superiores são uma fascinante e inexplorada fronteira biológica. Uma de suas características é a capacidade de produzir uma notável diversidade de metabólitos especiais (FLORES et al, 1999).

Muitas solanaceas de uso medicinal, como *Datura*, produzem uma grande diversidade de alcalóides tropano tanto em suas folhas como em raízes (NUSSBAUMER et al., 1998).

No Brasil raízes de *Piper umbellatum*, popularmente conhecida como gervão, são utilizadas no tratamento de diversas doenças sob a forma de extrato aquoso. Uma planta conhecida popularmente no Brasil como “colônia” (*Alpinia speciosa*) apresenta em seu rizoma alcalóides, esteróides, flavonóides e saponinas (VIEIRA, 1992).

Raízes de *Panax ginseng* são largamente utilizadas na medicina em todo o mundo por suas propriedades estimulantes e tónicas, e isto é decorrente da presença de saponinas triterpênicas, conhecidos por ginosídeos (TANAKA & KASAI, 1984).

Diterpenos ginkgolídeos são produzidos em abundância em raízes de *Ginkgo biloba*, planta cujo extrato aquoso é largamente utilizado no tratamento de doenças cardiovasculares. O alcalóide camptothecina, encontrado nas raízes da planta medicinal chinesa *Camptotheca acuminata*, tem sido usado em formulações de drogas para o combate ao câncer (FLORES & CURTIS, 1996).

São enormes as possibilidades de obtenção de produtos biologicamente ativos, a partir do sistema radicular dos vegetais. No Brasil, em particular, essas chances são ainda maiores, dada a enorme diversidade de espécies encontrada em nossas florestas.

2.7 Cultivo *in vitro* de Células, Tecidos e Órgãos Vegetais

O cultivo de plantas *in vitro*, com uso de meios ou soluções nutritivas em condições assépticas, tem sido objeto de estudo de pesquisadores desde 1902 (KRIKORIAN & BERQUAM, 1969). Porém, os estudos da aplicação desses cultivos para obtenção de metabólitos especiais de origem vegetal são mais recentes.

A técnica *in vitro*, apesar de laboriosa e relativamente cara, uma vez que exige que suas atividades sejam realizadas em ambiente asséptico e com luz e temperatura

controladas (TEIXEIRA & TORRES, 1998), apresenta-se como uma atrativa fonte alternativa de metabólitos especiais de alto valor, produzidos por plantas (DORNBURG & KNORR, 1997). Células de vegetais são biossinteticamente totipotentes, o que significa dizer que cada célula em cultura contém informação genética completa, sendo capaz de produzir a mesma gama de substâncias químicas que a planta mãe (RAO & RAVISHANKAR, 2002).

As vantagens dessa tecnologia em relação ao cultivo agrícola convencional são muitas, tais como a independência de variações dos diversos fatores ambientais e o fato do cultivo *in vitro* ser um sistema que permite plena estabilidade e uniformidade na produção de substâncias químicas, além da rápida produção.

Acreditou-se por muito tempo que tecidos não diferenciados, como calos ou suspensão celular cultivados *in vitro* não poderiam produzir compostos químicos a partir do metabolismo especial, diferentemente das células e tecidos especializados. ZENK (1991) provou que essa teoria estava errada, uma vez que obteve, a partir de cultura de células não-diferenciadas, 2,5 g de antraquinona por litro de meio de cultura. A partir de então, muitos estudos têm sido feitos visando-se a obtenção de metabólitos especiais a partir de cultura *in vitro* de plantas.

Cultura de suspensão celular têm sido alvo de muitos estudos. A mesma se destina à obtenção e proliferação de células em meio nutritivo líquido, sob condições de agitação, aeração e temperatura controladas. Nesse ambiente é essencial que as células suspensas se dividam e se multipliquem ativamente, sendo grandemente influenciadas pela composição do meio de cultura. (PESCADOR, et al., 2000). GODOY-HERNANDEZ & LOYOLA-VARGAS (1991) estabeleceram cultura de suspensão celular de *Catharanthus roseus*, e avaliaram o efeito de elicidores bióticos e abióticos sobre produção de alcalóides. Observaram que a exposição das células ao estresse osmótico levou ao aumento de cerca de 320% nos teores totais de alcalóides.

Além da cultura de células em suspensão, muitas outras técnicas têm sido desenvolvidas e estudadas para produção de certos compostos, como o cultivo de calos e parte aérea, bem como o co-cultivo desses diferentes órgãos e tecidos vegetais. Porém, a cultura de raízes transformadas tem demonstrado resultados muito significativos na produção, em larga escala industrial, de metabólitos especiais, com o uso de biorreatores (RAO & RAVISHANKAR, 2002). Isso se deve às muitas vantagens demonstradas por esse tipo de material quando em cultivo.

2.8 Cultura de Raízes Transformadas e Produção de Metabólitos Especiais

A infecção de espécies vegetais por estirpes virulentas de *Agrobacterium rhizogenes* leva à formação de raízes adventícias (BHADA et al., 1992; MALDONATO-MENDOZA, et al., 1993; BENSADDEK et al., 2001). Essas raízes são induzidas pela transferência do T-DNA da *Agrobacterium rhizogenes* para o tecido vegetal hospedeiro (AMBROS et al., 1986), resultando na formação de raízes devido a expressão de genes que codificam enzimas relacionadas à síntese de auxinas no DNA transferido. O plasmídio Ri de *Agrobacterium rhizogenes* também elicitá a síntese de opinas como manopina e agropina. A transformação natural de raízes é geralmente checada pela detecção de opinas (RAO & RAVISHANKAR, 2002).

Estas raízes geneticamente transformadas têm sido obtidas a partir de muitas espécies de dicotiledôneas medicinais, de um grande número de famílias (TEPFER, 1990) (Tabela 1). As raízes transformadas têm a capacidade de desenvolvimento em meio de cultura livre de hormônios ou reguladores de crescimento, produzindo grande

biomassa (KUZOVKINA, 1992). Na maioria dos casos, não necessita ser incubada sob luz. As raízes transformadas apresentam grande ramificação lateral e plagiotropismo (MOYANO et al., 1999), além de grande estabilidade genética e bioquímica, na produção dos metabólitos especiais (FLORES et al., 1987).

A manipulação e manutenção de culturas de raízes geneticamente transformadas é fácil e de baixo custo, quando comparada ao cultivo de outros órgãos e tecidos vegetais. Devido às grandes vantagens que as culturas de raízes transformadas apresentam, muitos compostos tradicionalmente produzidos por cultura de células em suspensão têm sido estudados quanto a viabilidade de sua produção por cultura de raízes transformadas. (RAO & RAVISHANKAR, 2002).

Culturas de raízes modificadas podem produzir quantidades de metabólitos especiais comparáveis às raízes dos vegetais intactos (FLORES et al., 1999; GIRI & NARASU, 2000) e são de grande importância para produção e estudo de compostos que tem sua biossíntese ligada à manutenção da organização dos tecidos radiculares (OKSMAN-CALDENTEY & HILTUNEN, 1996).

LUCZKIEWICZ et al. (2002), observaram que a pulquolina E (um composto terapêutico de ação antinflamatória, bacteriostática e com capacidade de diminuir o crescimento de tecidos cancerosos) foi produzida em maior quantidade em culturas de raízes transformadas geneticamente do que na planta intacta ou em cultura de calos e suspensão celular. FIGUEIREDO et al. (1995) observaram que a produção de óleo essencial de *Achillea millefolium* é 50 vezes maior em cultura de raízes transformadas (0,05%) do que em cultura de células em suspensão (0,001%).

Tabela 1 Algumas espécies transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* utilizadas para produção *in vitro* de seus metabólitos secundários.

Planta	Metabólito secundário	Referência
<i>Achillea millefolium</i>	Óleos essenciais	LOURENÇO et al., 1999
<i>Ammi majus</i>	Cumarinas	KROLICKA et al., 2001
<i>Artemisia absinthium</i>	Óleos essenciais e artemisina	LIU et al., 2002
<i>Atropa belladonna</i>	Atropina	AOKI et al., 1997
<i>Catharanthus roseus</i>	Alcalóides indólicos, Ajmalicina	VAZQUEZ-FLOTA et al., 1994
<i>Centaurea calcitrapa</i>	Enzimas proteolíticas	LOURENÇO et al., 2002
<i>Datura candida</i>	Escopolamina, hisociamina	NUSSBAUMER et al., 1998
<i>Daucus carota</i>	Flavonóides e antocianina	ARAÚJO et al., 2002
<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	Flavonóides	LI et al., 2001
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Chiquoninas e Benzoquinonas	SHIMOMURA et al., 1991
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nicotina e Anatabina	WALTON & McLAUCHLAN, 1990
<i>Panax ginseng</i>	Saponinas	MALLOL et al., 2001
<i>Pimpinella anisum</i>	Óleos essenciais	SANTOS et al., 1998
<i>Rudbeckia hirta</i> L.	Pulquelinina E	LUCZKIEUICZ et al., 2002
<i>Tricosanthes kirilowii</i> <i>maxim</i> var. <i>japonicum</i>	Proteínas de defesa	SAVARY & FLORES, 1994

Raízes transformadas geneticamente de *Hyssopus officinalis*, através da inoculação de pecíolos da planta com a linhagem LBA 9402 de *Agrobacterium rhizogenes*, apresentaram uma produção 60% maior de ácidos fenólicos, em especial ácido rosmarínico, do que culturas de calos, suspensão celular e raízes de um ano de plantas cultivadas (KOCIAN et al., 1999).

MALLOL et al. (2001) mostraram que raízes transformadas de *Panax ginseng*, transformadas pela linhagem A4 de *Agrobacterium rhizogenes*, é um eficiente sistema para produção *in vitro* das saponinas e ginosídeos produzidos pelos rizomas de plantas intactas, apresentando maior taxa de crescimento que culturas de calos e suspensão celular.

Além de diferenças quantitativas, podem ocorrer também diferenças qualitativas na produção de certos metabólitos secundários em cultura de raízes transformadas e

outros órgãos da planta. SANTOS et al. (1998), observaram que os constituintes do óleo essencial de erva doce variavam em culturas de raízes transformadas, raízes não-transformadas ou frutos. *Trans*-anetol, o principal constituinte do óleo essencial dos frutos analisados foi encontrado em quantidades traço em raízes transformadas. Resultados similares foram obtidos por LOURENÇO et al. (1999), onde foi analisado a produção de óleo essencial de *A. millefolium* em raízes normais e raízes transformadas por duas linhagens de *Agrobacterium rhizogenes*, LBA e A4.

Muitos compostos químicos de interesse econômico já são produzidos utilizando-se sistemas *in vitro* com raízes modificadas geneticamente, como por exemplo, atropina (AOKI et al., 1997), escopalamina (MAHAGAMASEKERA & DORAN, 1998), catarantina, ajmalicina, vimblastina e vincristina (VÁZQUEZ-FLOTA et al., 1994; MORENO-VALENZUELA et al., 1999), dentre outros.

As condições de cultivo exercem grande influência na taxa de crescimento e produção de metabólitos secundários de raízes modificadas. A composição do meio de cultura é de grande importância, e os principais fatores que podem variar são teores de nutrientes, sendo de grande influência o nitrogênio (NUSSBAUMER et al., 1998; BENSADDEK, 1998; OKSMAN-CALDENTEY et al., 1994), a fonte e a concentração de açúcar (YU et al., 1996; OKSMAN-CALDENTEY et al., 1994) e presença de reguladores de crescimento exógenos (SUBROTO et al., 1994; SAUERWEIN et al., 1992). Outro fator muito estudado, que exerce grande influência é a presença de elicitores no meio, como os ácidos tânico, acetilsalicílico e salicílico (GODOY-HERNANDES & LOYOLA-VARGAS, 1996).

As condições do ambiente de cultivo, como presença de luz (SAUERWEIN et al., 1992) e temperatura (YU et al., 1996) também podem modular a produção e acúmulo dos compostos de interesse.

Além do meio de cultivo, a linhagem de bactéria utilizada na infecção pode fazer variar a taxa de crescimento e a produção de metabólitos especiais. JAZIRI et al (1994) observaram que culturas de raízes de *Atropa belladonna* estabelecidas com a infecção da planta com a linhagem ATCC 15834 de *Agrobacterium rhizogenes* apresentava menor taxa de crescimento e maior produção de alcalóides que culturas estabelecidas pela infecção com a linhagem MAFF 03-01724.

2.9 Espécies Vegetais Estudadas

A seguir é feita uma descrição das espécies vegetais utilizadas neste trabalho.

Ocimum basilicum – Manjericão: espécie da família Labiatae, muito popular, conhecida também por alfavaca. Tem vasto uso na culinária e como ornamental. É conhecida por conter o composto fenólico antioxidante ácido rosmarínico, dentre outros ácidos fenólicos (ácido litospérmico) (TADA et al., 1996). Também é rico em óleo essencial, responsável por seu cheiro característico. Alguns dos constituintes de seu óleo essencial são linalol e metilchavicol. Seu óleo essencial alcança elevados preços no mercado, podendo chegar a 50 dólares o kg (GEORGE, 1995).

O óleo essencial de manjericão possui atividade antifúngica e de repelência de insetos (LAWRENCE, 1993). Apesar do grande uso e da importância do manjericão e de seu óleo essencial, pouco se conhece a respeito da biossíntese e da regulação dos compostos responsáveis pela qualidade da erva seca e fresca e que constituem seu óleo essencial. (LEWINSONHN et al, 2000).

Hyssopus officinalis – Hissopo: espécie da família Labiatae tem sua origem na Ásia Ocidental (Turquia, regiões do mar Cáspio), em locais montanhosos. Planta

medicinal arbustiva perene, com altura média de até 60 cm. Possui flores e folhas com aroma agradável de menta (cânfora - substância de ação sedativa e antiespasmódica). Produz um polissacarídeo, o MAR – 10, isolado de seu extrato aquoso, que apresenta forte atividade anti-HIV-1, com potencial de uso no tratamento de pacientes infectados com o vírus (GOLLAPUDI, 1995).

Foram obtidas culturas de raízes transformadas desta planta por KOCHAN et al., 1999, para avaliação da produção de ácido rosmarínico e outros ácidos fenólicos, que são comumente usados na indústria de alimentos como antioxidantes.

Anethum graveolens (Aneto) – O aneto é uma planta medicinal, de ciclo bianual ou anual, da família Umbelliferae. Tem sua origem no sudoeste da Ásia e Europa, sendo cultivada há muitos anos. Também rica em óleo essencial, que apresenta limoneno, α -felandrina e carvone como principais constituintes.

Estas substâncias apresentam pronunciada atividade biológica, com ação clastogênica. LAZUTKA et. al. (2001) observaram que o óleo essencial de aneto, tanto extraído das folhas como das sementes, apresentou grande capacidade de gerar aberrações cromossômicas, bem como alterações nas cromátides irmãs em linfócitos humanos, quando comparado ao óleo essencial de outras espécies. Com isso, conclui-se ser o mesmo genotóxico.

O (+)-carvone, que compreende cerca de 50% do óleo essencial de aneto, é uma substância com capacidade de inibição de brotação em batata, no armazenamento (WANDER & BOUWMEESTER, 1998). O teor de (+)-carnone em sementes de aneto é fortemente influenciado pela adubação nitrogenada. Segundo os autores, o máximo teor de (+)-carvone em sementes de aneto é obtido com aplicação de nitrogênio variando de 30 a 60 kg.ha⁻¹ de N.

Piper hispidinervium – Pimenta-longa: espécie arbustiva aromática, que ocorre naturalmente da Floresta Amazônica até o sudoeste brasileiro. É produtora de óleo essencial volátil correspondente a 2,7% da sua massa verde total (SIMIONATTO et al., 1997), que apresenta concentrações superiores a 80% do importante metabólito secundário, safrol.

O safrol ou 4 - alil -1,2 - metilenodioxibenzeno, é um éter fenólico do grupo dos anilpropanóides. Embora apresente comprovada atividade carcinogênica *in vitro*, é de grande importância científico-tecnológica como precursor de uma variedade de compostos, notadamente, fármacos, bioinseticidas biodegradáveis, fixadores de aroma e, mais recentemente, de drogas antitrombóticas e auxinas endólicas (ROSA et al. 2000).

A obtenção de safrol no Brasil até cerca de 1990 era decorrente da atividade extrativista, onde a obtenção do óleo essencial ao longo de, aproximadamente, 45 anos, levou ao comprometimento da disponibilidade de canela (*Ocotea odorifera*), principal geradora desse composto (PESCADOR et al, 1998). Na tentativa de se conseguir reverter esse quadro, pesquisadores se empenharam em descobrir fontes alternativas de safrol, chegando-se à pimenta longa, que mostrou ser a mais promissora fonte natural e ecologicamente segura de safrol. Desde então, esta espécie passou a ser de grande interesse econômico (SILVA et al, 2000).

Muitos estudos têm sido conduzidos na tentativa de se obter alternativas biotecnológicas para produção de safrol em escala industrial, sendo desenvolvidos trabalhos com cultura de calos, embriogênese somática e cultura de suspensão celular dessa espécie vegetal, e de outras espécies do gênero *Piper* sp. (PEREIRA et al, 2000). Essa espécie tem demonstrado boa adaptação ao cultivo *in vitro*, respondendo com variação quantitativa na produção de safrol de acordo com as condições impostas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Inoculação de Plantas Inteiras de Diferentes Espécies Vegetais em Vasos com *Agrobacterium rhizogenes*

a) Cultivo de plantas de plantas de *Ocimum basilicum* (manjericão), *Foeniculum vulgare* (funcho), *Salvia officinalis* (sálvia) e *Catharanthus roseus* (catarantus)

Plantas de manjericão, funcho, sálvia e catarantus foram cultivadas em vasos de 2 L, contendo terra proveniente de um Argissolo Vermelho-Amarelo. As plantas foram produzidas a partir da germinação de sementes comerciais obtidas junto à Agristar do Brasil®. As plantas foram mantidas em cultivo por 45 dias até a inoculação.

Após a germinação foram mantidas seis plantas por vaso.

b) Linhagens de *Agrobacterium* utilizadas

Neste experimento foram trabalhadas todas as linhagens selvagens de agrobactéria disponíveis, com o objetivo de selecionar as linhagens mais infectivas para cada espécie vegetal utilizada.

As linhagens selvagens utilizadas foram obtidas na EMBRAPA – CENARGEN e na UERJ: A4, 8196, 9402, 2659, 2659 G, 17242, LBA, 15834.

c) Obtenção do inóculo de *Agrobacterium*

As bactérias foram cultivadas em meio YMB¹ sólido por duas semanas.

Uma colônia das linhagens A4, 8196, 9402, 2659, 2659 G, 17242, LBA e 15834 de *Agrobacterium rhizogenes* foi inoculada em 10 ml de meio de crescimento líquido. As bactérias foram incubadas em agitador orbital (100 a 150 rpm), à temperatura de 25 a 28°C. Essas culturas de bactérias atingem a fase de crescimento exponencial ($A_{600} = 0,5$ a 1,0) entre 12 e 16 horas, sendo, portanto, esse o tempo no qual elas ficaram incubadas.

Uma alíquota de 1,5 ml de cada suspensão bacteriana foi então transferida para um tubo de microcentrifuga estéril e centrifugada a 14.000 X g durante 3 minutos.

O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 300 µl em solução salina NaCl 0,85%.

d) Método de Inoculação

As seis plantas que foram mantidas em cada vaso foram feridas com palitos de dente esterilizados, e anteriormente imersos em suspensão bacteriana por cerca de cinco minutos. Os locais de infecção foram envolvidos por filme plástico de PVC para evitar desidratação.

¹ Composição dos meios de cultivo de *Agrobacterium rhizogenes* e de planta estão em anexo.

O crescimento e desenvolvimento dos calos e das raízes em cada ponto de infecção foram observados e seu desenvolvimento monitorado semanalmente.

e) Repicagem e manutenção das raízes

Os tumores e raízes foram extraídos das plantas, lavados em etanol 70%, por um minuto, e desinfestados em uma solução de hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos.

Os tecidos foram mantidos por oito horas em solução de tetraciclina (25 mg.L⁻¹), sob agitação (50 a 100 rpm). O material foi então seco em papel de filtro esterilizado.

Os tumores ou raízes foram então transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura B5 ½ força iônica sem regulador de crescimento, contendo 500 mg.L⁻¹ de cefotaxima sódica. As placas foram mantidas em câmaras de crescimento, no escuro, a 25°C.

3.2 Inoculação de Explantes Vegetais Obtidos de Plantas de *Ocimum basilicum* Cultivadas em Vasos com Linhagens Selvagens de *Agrobacterium rhizogenes*.

Esse método se baseia no protocolo de CIAU-UITIZ et al. (1994), no qual se fez uma modificação: utilizou-se discos foliares provenientes de plantas cultivadas em casa de vegetação. Nesse teste do método, foram usadas apenas plantas de manjericão.

a) Cultivo de plantas de *Ocimum basilicum* (manjericão)

Conforme anteriormente descrito no item 3.1 a.

b) Obtenção dos explantes vegetais

Os explantes (discos foliares) foram obtidos de plantas cultivadas em casa de vegetação.

Foram utilizados discos foliares de 0,8 x 0,8 cm aproximadamente, que foram lavados em etanol 70%, por um minuto, e desinfestados em uma solução de hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos.

Os discos foram então lavados em água destilada estéril por três vezes.

c) Linhagens de *Agrobacterium* utilizadas.

As linhagens selvagens A4, LBA, 8196, 9402, 2659 G de *Agrobacterium* foram obtidas na EMBRAPA – CENARGEN e na UERJ. Foram utilizadas apenas as linhagens de bactéria que apresentaram melhor desempenho quando inoculadas em plantas inteiras, conforme descrito no item 3.1.

d) Obtenção do inóculo de *Agrobacterium*

Conforme anteriormente descrito no item 3.1 c.

e) Método de inoculação

O experimento foi montado colocando-se cinco discos foliares por placa de Petri, contendo meio B5 ½ força iônica adicionado de 500 mg.L⁻¹ de cefotaxima sódica. Os explantes de manjericão foram inoculados com cada estirpe de agrobactéria, sendo

que foram feitas cinco placas de Petri para o teste de cada bactéria, colocando-se cinco explantes por placa. Foram mantidas cinco placas controle (Tabela 2), onde os explantes receberam apenas solução salina 0,85%. Após 15 dias, foi feita a avaliação do experimento, no qual se observou a formação de raízes adventícias a partir dos explantes, tendo-se o controle como referência.

Tabela 2 Esquema de montagem do experimento para inoculação de *Ocimum basilicum* com *Agrobacterium rhizogenes*.

Tratamentos	Repetições (nº de placas)	Nº total de explantes inoculados
A4	5	25
LBA	5	25
8196	5	25
9402	5	25
2659G	5	25
Controle	5	25

f) Repicagem e manutenção das raízes

As raízes obtidas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio B5 sólido $\frac{1}{2}$ 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 quatro repicagens com intervalos de 20 dias entre elas.

3.3 Inoculação de Explantes Vegetais Obtidos de Plantas Cultivadas *in vitro* com Linhagens Selvagens de *Agrobacterium rhizogenes*.

3.3.1 Inoculação de manjericão-roxo var. Dark Opal e manjericão-verde var. Minete Anão com as linhagens A4, LBA e 8196 de *Agrobacterium rhizogenes*.

Esse experimento foi montado com o objetivo de se estudar a morfogênese diferencial dos dois explantes vegetais utilizados, quando inoculados com diferentes linhagens selvagens de *Agrobacterium rhizogenes*.

a) Cultivo das plantas

Neste experimento foram utilizadas plantas cultivadas *in vitro*, produzidas a partir de sementes comerciais germinadas em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) $\frac{1}{2}$ força iônica.

Foram colocadas para germinar em meio de cultura sementes de manjericão de duas variedades: manjericão roxo var. Dark Opal e manjericão verde var. Minete Anão.

b) Obtenção dos explantes vegetais

As sementes de manjericão-roxo var. Dark Opal 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 3 enxagües em água destilada e autoclavada.

Em seguida, as sementes foram inoculadas em meio de cultura composto da metade da concentração dos sais básicos de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), e suplementados pelo complexo vitamínico B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), 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. O meio foi vertido em frascos de vidro de 350 ml de capacidade, contendo aproximadamente, 50 ml de meio em cada e vedados com tampas de polipropileno. Após o processo de autoclavagem e solidificação do meio, foram inoculadas, em média, 20 a 25 sementes por frasco. As culturas foram transferidas para sala de crescimento e mantidas sob irradiação em torno de 36 µmoles m⁻² s⁻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 30 dias de idade, contados a partir da emissão de radícula, foram utilizadas como fonte de explantes. 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 foram individualizados. Das folhas retirou-se o pecíolo e os bordos, para aumentar a exposição das células vegetais à bactéria.

c) Linhagens de *Agrobacterium* utilizadas

As linhagens de bactéria utilizadas foram A4, LBA e 8196, uma vez que nos testes anteriores estas demonstraram maior taxa de infecção.

d) Obtenção do inóculo de *Agrobacterium*

As linhagens de *Agrobacterium rhizogenes* foram cultivadas em meio líquido YMB (20 ml em frascos Erlemeyer de 100 ml) por 24 horas, no escuro, sob rotação (100 rpm). Uma amostra de 200 µl do meio de crescimento da bactéria foi adicionada a 20 ml de meio líquido B5 a ½ força iônica, em frascos de Erlemeyer de 100 ml.

e) Método de inoculação

Segmentos nodais e folhas das duas diferentes variedades de manjericão foram inoculados com as bactérias, e se observou a formação de raízes, calos e brotações a partir dos pontos de infecção, bem como oxidação e necrose dos explantes.

Foram colocados seis folhas ou segmentos de caule por placa de Petri, contendo meio B5 ½ força iônica com 500 mg L⁻¹ de cefotaxima sódica (Tabela 3).

Tabela 3 Esquema de montagem do experimento para inoculação de duas variedades de manjericão com três linhagens selvagens de *Agrobacterium rhizogenes*.

Tratamentos	Repetições (nº de placas)	Nº total de explantes inoculados
A4	5	30
LBA	5	30
8196	5	30
Controle	5	30

A inoculação foi feita baseada em protocolo proposto em TADA et al. (1996), que demonstrou ser bastante eficiente para esta espécie vegetal. Os explantes de folha e segmentos nodais foram adicionados ao meio de cultura YMB contendo cultura da bactéria, em frascos Erlemeyer de 100 ml. Os explantes e a bactéria formaram uma co-cultura por dois dias, no escuro, sob rotação (100 rpm).

Os explantes infectados foram então lavados com água destilada estéril, e transferidos para meio MS ou B5 a $\frac{1}{2}$ força iônica sólido, contendo o antibiótico Cefotaxima (500 mg.L⁻¹).

f) Repicagem e manutenção das raízes

As raízes obtidas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio B5 sólido $\frac{1}{2}$ 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 quatro repicagens com intervalos de 20 dias.

3.3.2 Inoculação de explantes de aneto, lavanda e hissopo com as linhagens A4, LBA, 8196 e 17242 de *Agrobacterium rhizogenes*.

a) Cultivo das plantas

Neste experimento foram utilizadas plantas cultivadas *in vitro*, produzidas a partir de sementes comerciais germinadas em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ força iônica.

Foram colocadas para germinar em meio de cultura sementes de aneto e lavanda.

b) Obtenção dos explantes vegetais

As sementes de aneto, lavanda e hissopo 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 3 enxagues em água destilada e autoclavada.

Em seguida, as sementes foram inoculadas em meio de cultura composto da metade da concentração dos sais básicos de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), e suplementados pelo complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), 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 \pm 0,1 antes da autoclavagem. O meio foi vertido em frascos de vidro de 350 ml de capacidade, contendo aproximadamente, 50 ml de meio em cada

e vedados com tampas de polipropileno. Após o processo de autoclavagem e solidificação do meio, foram inoculadas, em média, 10 sementes por frasco. As culturas foram transferidas para sala de crescimento e mantidas sob irradiação em torno de 36 μ moles $m^{-2} s^{-1}$, 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 40 dias de idade, contados a partir da emissão de radícula, foram utilizadas como fonte de explantes. 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 foram individualizados. Das folhas retirou-se o pecíolo e os bordos, para aumentar a exposição das células vegetais à bactéria.

c) Linhagens de *Agrobacterium* utilizadas

As linhagens de bactéria utilizadas foram A4, LBA, 8196 e 17242.

d) Obtenção do inóculo de *Agrobacterium*

Conforme anteriormente descrito no item 3.1 c.

e) Método de inoculação

Folhas de aneto, lavanda e hissopo foram inoculadas com as bactérias, e se observou a formação de raízes, calos e brotações a partir dos pontos de infecção, bem como oxidação e necrose dos explantes.

Foram colocadas seis folhas por placa de Petri, contendo meio B5 $\frac{1}{2}$ força iônica com 500 mg.L⁻¹ de cefotaxima sódica (Tabela 4).

Tabela 4 Esquema de montagem do experimento para inoculação de aneto, lavanda e hissopo com três diferentes linhagens selvagens de *Agrobacterium rhizogenes*.

Tratamentos	Repetições (nº de placas)	Nº total de explantes inoculados
A4	5	30
LBA	5	30
8196	5	30
17242	5	30
Controle	5	30

Os explantes de folha e segmentos nodais foram adicionados ao meio de cultura YMB contendo cultura da bactéria, em frascos Erlemeyer de 100 ml. Os explantes e a bactéria formaram uma co-cultura por dois dias, no escuro, sob rotação (100 rpm).

Os explantes infectados foram então lavados com água destilada estéril, e transferidos para meio MS ou B5 a $\frac{1}{2}$ força iônica sólido, contendo o antibiótico Cefotaxima (500 mg.L⁻¹).

f) Repicagem e manutenção de calos e raízes

Os calos e as raízes obtidas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio B5 sólido $\frac{1}{2}$ 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 quatro repicagens com intervalo de 20 dias entre elas.

3.4 Inoculação de Explantes Vegetais com a Estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*.

3.4.1 Inoculação de explantes de folha e segmentos de caule de hissopo com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*.

a) Cultivo das plantas

Conforme descrito anteriormente no item 3.3.1 a.

b) Obtenção dos explantes vegetais

Conforme descrito anteriormente no item 3.3.1 b.

c) Linhagem de *Agrobacterium* utilizada

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

A linhagem R1601 é uma linhagem de laboratório obtida por conjugação *in vitro* (PYTHOUD et al., 1987), conforme descrito a seguir: da bactéria C58 de *Agrobacterium tumefaciens* foi retirado o plasmídio Ti. A bactéria sem o plasmídio passou a se chamar A136, que é resistente a rifampicina. Esta linhagem produz agropina (pRiA4).

No plasmídio Ri da linhagem A4 de *Agrobacterium rhizogenes* foi clonado o gene *nptII* (para expressão em planta) e o gene para resistência a ampicilina (por seleção na bactéria). O plasmídio resultante é o R1500. Posteriormente foi introduzido na linhagem R1500 o cosmídio pTVK291 (KOMARI et al, 1980), que contém parte da região vir do plasmídio pTiBo542 e que confere um fenótipo supervirulento.

Assim, a linhagem A136 contendo o pR1500 e o pTVK291 passou a ser chamada de R1601.

d) Obtenção do inóculo de *Agrobacterium*

No dia anterior à inoculação dos explantes, culturas líquidas foram iniciadas mediante transferência de uma colônia isolada crescida em meio sólido, para 10 ml de meio *Rhizo* líquido, contendo a concentração adequada de antibióticos de seleção (ampicilina a 100 mg L^{-1} e canamicina a 100 mg L^{-1}). O período de incubação foi de 12 a 16 horas, à temperatura de 28°C , no escuro, sob agitação orbital de 100 rpm.

O crescimento bacteriano foi monitorado por leituras espectrofotométricas a 600 nm, e, uma vez atingido o valor de densidade ótica ($\lambda = 60 \text{ nm}$) de 0,6, o crescimento foi interrompido, a suspensão centrifugada (4.000 rpm; 10 min), o sobrenadante descartado, e, substituído por igual volume de meio MS líquido.

e) Método de inoculação

Raízes transformadas de hissopo foram induzidas a partir de folhas e segmentos de caule infectados com *Agrobacterium rhizogenes*, estirpe R1601.

Aos 30 dias de cultivo, plantas de hissopo foram dissecadas, onde folhas e caule foram separados, sendo então imersos por 20 minutos em meio de cultura *Rhizo* (acrescido de 100 mg.L⁻¹ do antibiótico ampicilina e 100 mg.L⁻¹ do antibiótico canamicina) contendo a bactéria em crescimento.

Os explantes inoculados foram mantidos em co-cultura por 24 horas, sendo posteriormente transferidos para meio de cultura MS sólido ½ força iônica acrescido de cefotaxima (500 mg.L⁻¹). Foram, então, cultivados em sala de crescimento sob irradiação em torno de 36 µmoles m⁻² s⁻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), até que ocorresse a diferenciação de raízes.

Raízes começaram a aparecer após 15 dias de cultivo, sendo excisadas e transferidas aos 20 dias.

f) Repicagem e manutenção das raízes

Conforme descrito anteriormente no item 3.3.1 f.

g) Estabelecimento de culturas clonais de raízes geneticamente transformadas de hissopo

Culturas clonais de hissopo foram estabelecidas a partir de segmentos individualizados das raízes que se formaram a partir dos sítios de infecção dos explantes de folha.

3.4.2 Inoculação de explantes de folha de manjericão-roxo var. Dark Opal e manjericão-verde var. Minete Anão com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*.

a) Cultivo das plantas

Conforme descrito anteriormente no item 3.3.1 a.

b) Obtenção dos explantes vegetais

Conforme descrito anteriormente no item 3.3.1 b.

c) Linhagem de *Agrobacterium* utilizada

Conforme descrito anteriormente no item 3.4.1 c.

d) Obtenção do inóculo de *Agrobacterium*

Conforme descrito anteriormente no item 3.4.1 d.

e) Método de inoculação

Conforme descrito anteriormente no item 3.4.1 e.

f) Repicagem e manutenção das raízes

Conforme descrito anteriormente no item 3.4.1 f.

g) Estabelecimento de culturas clonais de raízes geneticamente transformadas de manjericão

Conforme descrito anteriormente no item 3.4.1 g.

3.4.3 Inoculação de explantes de folha de pimenta-longa com e sem ácido sinapínico com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*.

A pimenta longa não foi infectada por nenhuma das linhagens selvagens de *Agrobacterium rhizogenes* trabalhadas (dados não mostrados), o que sugere que esta espécie vegetal seja menos suscetível. Desta forma, foi feito um outro experimento utilizando-se uma estirpe supervirulenta, chamada R1601. Também foi adicionado ácido sinapínico ao meio de cultivo da *Agrobacterium rhizogenes*, uma vez que a literatura cita este composto como sendo um regulador da região *vir* do plasmídio Ri de *Agrobacterium rhizogenes*, responsável pela infecção (STACHEL, 1985).

a) Cultivo das plantas

Sementes de *Piper 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 3 enxagues em água destilada e autoclavada.

Em seguida, as sementes foram inoculadas em meio de cultura composto da metade da concentração dos sais básicos de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), e suplementados pelo complexo vitamínico B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), 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. O meio foi vertido em frascos de vidro de 350 ml de capacidade, contendo aproximadamente, 50 ml de meio em cada e vedados com tampas de polipropileno. Após o processo de autoclavagem e solidificação do meio, foram inoculadas, em média, 25 sementes por frasco. As culturas foram transferidas para sala de crescimento e mantidas sob irradiação em torno de 36 µmoles m⁻² s⁻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. 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 foram individualizados. Das folhas retirou-se o pecíolo e os bordos, para aumentar a exposição das células vegetais à bactéria.

b) Obtenção dos explantes vegetais

Os explantes de folha foram retirados de plantas cultivadas *in vitro*, a partir de sementes, de *Piper hispidinervium*. Foram usadas folhas, das quais foram retirados o pecíolo e os bordos.

c) Linhagem de *Agrobacterium* utilizada

Conforme descrito anteriormente no item 3.4.1 c.

d) Obtenção do inóculo de *Agrobacterium*

A bactéria foi colocada para crescer no meio de cultura *Rhizo*, por 24 horas, com ou sem a adição de ácido sinapínico (20 μM). Foram usados frascos erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio *Rhizo* líquido (suplementado com 100 mg.L^{-1} do antibiótico canamicicina e 100 mg.L^{-1} do antibiótico 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}).

e) Método de inoculação

As folhas foram imersas no meio *Rhizo*, com e sem ácido sinapínico, por cerca de 10 minutos.

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 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.

f) Repicagem e manutenção das 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.

g) Estabelecimento de culturas clonais de raízes geneticamente transformadas de pimenta longa

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.

3.5 Caracterização da Transformação Genética

Para a confirmação das raízes transformadas foram realizadas reações da polimerase em cadeia (PCR), utilizando-se 'primers' específicos para o gene *npt* II. O DNA genômico de raízes de regenerantes foi extraído, segundo metodologia de Ferreira e Grattapaglia (1996), 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. A seqüência dos 'primers' ("Life Technologies, Inc.", Rockville, EUA) são relacionadas abaixo NPT r (G C G G T C A G C C C A T T C G C C G C C) e NPT f (T C A G C G C A G G G C G C C C G G T T). Como controle negativo foi utilizado DNA de tecidos vegetais não transformados e como controle positivo plasmídeos purificados, contendo o gene *npt*II.

As condições de amplificação foram conforme descrito no Quadro 1. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1,0%, mediante o uso de tampão TAE 0,5 X, e após coloração com brometo de etídio, a imagem foi capturada no sistema Eagle Eye (Stratagene).

Quadro 1 Esquema dos ciclos para a reação de polimerase em cadeia (PCR) para amplificação de gene neomicina fosfotransfersase (*npt*II)

Passo	Temperatura	Tempo (min.)
	(° C)/nº de ciclos	
1	94	3
2	94	1'00"
3	64	1
4	72	1'00"
5	Goto 2, 34x	
6	72	10
7	4	For ever
8	End	

3.6 Análise Qualitativa de Safrol

Plantas inteiras de pimenta longa, obtidas a partir de cultivo *in vitro*, foram divididas em duas partes: parte aérea e raiz. Essas partes foram pesadas e trituradas, sendo então submetidas à destilação por arraste a vapor por uma hora, quando se usou o *n*-hexano como solvente, ou uma hora e meia quando se usou diclorometano. Fez-se então extração do material destilado com *n*-hexano ou diclorometano (4 x 10 mL), e este foi então tratado com sulfato de magnésio, filtrado gravimetricamente e concentrado em evaporador rotatório. Os resíduos obtidos foram então guardados para caracterização da presença do safrol por cromatografia em fase gasosa, comparando-se o tempo de retenção das amostras com aquele obtido para o padrão PA.

A análise cromatográfica foi conduzida em aparelho HP 5890 – série II, com detector de ionização de chama e coluna capilar 100% dimetilpolisiloxano (PONA 25 m de comprimento x 0,2 mm diâmetro interno x 0,50 µm filme) sendo empregado o hélio como gás de arraste, regulado para fornecer uma velocidade linear de 1,5 mL / minuto. A temperatura inicial para análise foi de 70°C mantido por um minuto, e depois com uma taxa de aquecimento de 5°C / minuto, até 250°C. As amostras foram injetadas no modo 'split' e detectadas a 280°C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inoculação de Plantas Inteiras em Vasos

Esse método serviu para que fossem selecionadas as bactérias que melhor interagissem com a planta de manjericão e as outras plantas utilizadas. Para isso acompanhou-se o desenvolvimento das raízes (antecedido ou não pela formação de tumor) a partir do sítio de infecção nas plantas cultivadas em solo e inoculadas com *Agrobacterium rhizogenes*.

As estirpes que melhor infectaram as plantas de manjericão-roxo foram: A4, LBA, 8196 e 9402. Em todas as seis plantas inoculadas por estas estirpes, em cada um dos pontos de infecção se verificou a formação de galhas e raízes.

As plantas de *Catharanthus* infectadas mostraram alta suscetibilidade às linhagens A4 e 8196, uma vez que os indivíduos inoculados manifestaram todos os sintomas característicos do processo de infecção.

Já as plantas de funcho e sálvia mostraram pouca suscetibilidade a todas as linhagens de *Agrobacterium rhizogenes* utilizadas, nesse método de inoculação. Não se verificou a formação de galhas ou raízes a partir dos pontos de inoculação, não sendo verificada nenhuma outra modificação na morfologia da planta.

4.2 Inoculação em Explantes Vegetais Obtidos de Plantas Cultivadas em Vasos.

Houve grande contaminação endógena do material colocado em meio de cultura estéril em placas de Petri (cerca de 70% das placas contaminaram). Os explantes que não contaminaram, inclusive controle, produziram raízes. Essas raízes foram então isoladas em meio B5 ½ força iônica líquido, em frascos Erlenmeyer. Foi observado crescimento das mesmas após serem retiradas dos explantes. Porém, 25 dias após a retirada, todas as raízes necrosaram, o que sugere que as mesmas não estavam transformadas geneticamente.

4.3 Inoculação de Explantes Vegetais Obtidos de Plantas Cultivadas *in vitro* com Linhagens Selvagens de *Agrobacterium rhizogenes*.

Os problemas com contaminação endógena, observados quando se utilizou explantes retirados de plantas em casa de vegetação, foram contornados, fato esse comprovado pela ausência de explantes contaminados com fungos ou bactérias. Quando se utilizou material vegetal proveniente de plantas cultivadas *in vitro*, os resultados mostraram que o ajuste de concentração do inóculo bacteriano é muito importante, principalmente para a linhagem A4, que é bastante agressiva, o que pode estabelecer severa competição com os explantes durante o co-cultivo, o que é demonstrado pela elevada taxa de oxidação e necrose dos explantes.

4.3.1 Inoculação de diferentes explantes de manjericão-roxo e manjericão-verde com as linhagens A4, LBA e 8196 de *Agrobacterium rhizogenes*.

A morfogênese e desenvolvimento dos explantes inoculados com as linhagens 8196 e LBA são diferentes entre si, bem como do controle. Os explantes inoculados com a linhagem 8196 apresentam maior formação de calos, sendo que estes antecedem a formação das raízes. Já nos explantes inoculados com a linhagem LBA a formação das raízes é direta, sem a prévia formação de calos no sítio de infecção.

Os resultados nas Tabelas 5 e 6 mostram que ocorreu variação na morfogênese dos explantes de folha e segmentos de caule de manjericão, verde ou roxo, quando inoculados com diferentes linhagens selvagens de *Agrobacterium rhizogenes*.

Tabela 5 Respostas morfogenéticas apresentadas por explantes de folha e segmentos de caule de manjericão-verde var. Minete Anão, 20 dias após inoculação com diferentes linhagens selvagens de *Agrobacterium rhizogenes* (30 explantes / linhagem de bactéria)

Linhagens de <i>Agrobacterium</i>	Resposta Morfogenética (% de explantes)								
	Explante de folha			Explante de seg. de caule			Raiz	Calo	Necrose
	Raiz	Calo	Necrose	Raiz	Calo	Necrose			
8196	13,3	0	53,3	53,3	0	0			
LBA	46,7	3,3	0	10	0	73,3			
A4	0	3,3	90	16,7	0	3,3			
Controle	20	0	86,7	73,3	3,3	0			

Tabela 6 Respostas morfogenéticas apresentadas por explantes de folha e segmentos de caule de manjericão-roxo var. Dark Opal, 20 dias após inoculação com diferentes linhagens selvagens de *Agrobacterium rhizogenes* (30 explantes / linhagem de bactéria)

Linhagens de <i>Agrobacterium</i>	Resposta Morfogenética (% de explantes)								
	Explante de folha			Explante de seg. de caule			Raiz	Calo	Necrose
	Raiz	Calo	Necrose	Raiz	Calo	Necrose			
8196	23,3	73,3	0	66,7	33,3	0			
LBA	73,3	23,3	0	90	0	6,7			
A4	26,7	0	0	3,3	0	0			
Controle	73,3	3,4	0	76,7	3,3	0			

Analisando a Tabela 5, observa-se que as estirpes LBA e 8196 reduziram a oxidação e necrose dos explantes de folha de manjericão-verde (0 e 53,5%, respectivamente), quando comparada ao controle e à bactéria A4 (86,7 e 90%, respectivamente). Resultado inverso, porém, foi obtido nos explantes de segmentos de caule (Tabela 5). Isso pode estar correlacionado à produção de hormônios vegetais, uma vez que o processo de transformação, com integração da região T-DNA do plasmídio bacteriano ao genoma vegetal, leva a modificações no comportamento padrão da planta, no que diz respeito à síntese de hormônios e à sensibilidade aos mesmos. CAPONE et al. (1987) sugerem que células infectadas por *Agrobacterium rhizogenes* são mais sensíveis à auxina, mas não se observa o aumento na quantidade de auxinas nesses tecidos.

Podem ser observadas também diferenças dependentes da estirpe bacteriana e da parte vegetal utilizada para a inoculação. MALLOL et al. (2001), verificaram que explantes de *Panax ginseng*, quando inoculados com a linhagem A4 de *Agrobacterium rhizogenes* podem apresentar três diferentes morfologias, e essas dependem diretamente do conjunto de fragmentos de genes transferidos para a planta no momento da infecção. Foram identificados genes chamados *aux*, responsáveis pela produção de uma quantidade adicional de auxinas, que quando presente, confere às raízes um aspecto de calo.

Além disso, explantes de manjericão-roxo se mostraram mais resistentes à manipulação *in vitro* e ao processo de inoculação que os explantes de manjericão-verde, o que deve ser levado em consideração no momento da escolha do material vegetal a ser trabalhado.

A tabela 6 mostra que a bactéria 8196 leva à formação intensa de calos, tanto em explantes de caule quanto em explantes de folha de manjericão-roxo (33% dos explantes de caule e 73,3% dos explantes de folha apresentaram formação de calos bastante volumosos). Essa alta formação de calo é acompanhada de uma menor produção de raízes. O contrário pode ser observado na bactéria LBA, que levou a uma intensa formação de raízes (90 e 73,3% dos explantes de caule e folha, respectivamente, apresentaram formação de raízes), sem a formação de calos. Porém, as raízes formadas a partir de explantes inoculados com a estirpe 8196 apresentaram maior diâmetro e menos ramificadas do que as raízes originadas a partir de explantes inoculados com a bactéria LBA, que apresentaram morfologia muito similar às raízes dos explantes controle.

MALDONATO-MENDOZA et al. (1993) observaram que diferentes estirpes de *Agrobacterium rhizogenes*, quando inoculadas na mesma espécie vegetal induzem a diferentes respostas morfológicas, gerando calos ou raízes, tendo estes diferentes taxas de crescimento.

Essas diferenças na morfologia dos explantes inoculados com as agrobactérias podem ser usadas para caracterizar as diferenças entre os conjuntos de genes transferidos por cada bactéria, o que torna cada processo de interação único.

Assim, a produção de metabólitos secundários pode vir a ser modificada em cada caso, ocorrendo mudança na quantidade e no perfil das substâncias sintetizadas em cada situação. Mais estudos são necessários, porém, para que se possa estabelecer qualquer correlação a respeito.

As raízes produzidas nos explantes controle de manjericão-roxo foram transferidas para meio de crescimento livre de hormônios e apresentaram grande desenvolvimento, com acelerado crescimento, sendo esse um fato nunca citado em literatura. Isso pode estar correlacionado ao teor endógeno de auxina dessa espécie, mas ainda é prematura qualquer afirmação.

Apesar de apresentarem acelerado crescimento, essas raízes entraram em senescência antes de completarem 30 dias de cultivo, além de apresentarem pouca estabilidade no crescimento com o passar do tempo, uma vez não é possível se obter grande quantidade de raízes em um sub-cultivo originado a partir de pouco inóculo inicial, o que é característico das raízes transformadas.

4.3.2 Inoculação de explantes de aneto, lavanda e hissopo com as linhagens A4, LBA, 8196 e 17242 de *Agrobacterium rhizogenes*.

A Tabela 7 mostra as diferentes respostas morfogenéticas observadas em explantes de segmento de caule de aneto obtidas após inoculação com diferentes estirpes de *Agrobacterium rhizogenes*. Observa-se que, assim como para manjericão, a bactéria 8196 apresentou maior taxa de indução à formação de calos, enquanto a bactéria LBA induziu apenas a formação de raízes.

Deve ser observado que o controle não induziu à formação de calos, o que mostra que a inoculação com as bactérias 8196 e A4 modificou o padrão de produção de hormônios no tecido vegetal.

MOYANO et al. (1999) observaram diferentes morfologias em culturas de raízes de *Datura metel* transformadas pela linhagem A4 de *Agrobacterium rhizogenes*. Isso foi correlacionado à presença de um gene chamado *aux* ligado a síntese suplementar de auxina, conforme observado por MALLOL et al. (2001). Assim, pode ser proposto que algumas estirpes de *Agrobacterium rhizogenes*, como 8196 e A4, por transferirem esse gene induzem à formação de calos, ou raízes calosas.

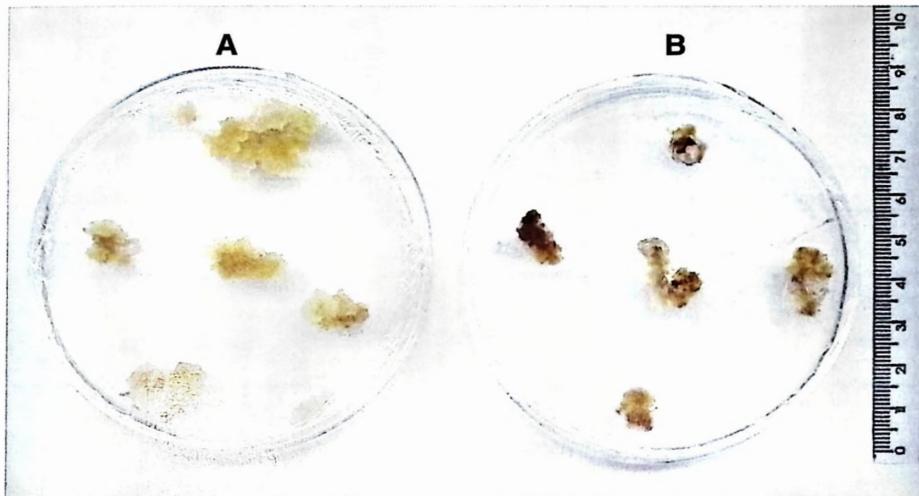
Tabela 7 Respostas morfogenéticas apresentadas por explantes de segmentos de caule de aneto, 20 dias após inoculação com diferentes linhagens selvagens de *Agrobacterium rhizogenes*.

Linhagens de <i>Agrobacterium</i>	Resposta Morfogenética (% de explantes de caule de aneto)		
	Raiz	Calo	Necrose
8196	69	92	0
LBA	85	0	0
A4	56	74	4
17242	12	36	57
Controle	76	0	0

Foi observado o surgimento de grande massa de calos e de raízes na região lesionada dos explantes de aneto em todos os tratamentos (explantes inoculados com a linhagem 8196, LBA e controles não inoculados) 20 dias após a inoculação. Esses calos e raízes foram excisados dos explantes e reinoculados em meio MS acrescido de 500 mg.L⁻¹ de cefotaxima sódica, sem reguladores de crescimento (Figura 2).

Foi observado que os calos desenvolvidos nos explantes controle e inoculados com a linhagem LBA, 30 dias após a reinoculação em meio livre de reguladores, se encontravam completamente necrosados.

Figura 2 (A) calos de aneto, 50 dias após serem retirados dos explantes. Esses calos foram obtidos a partir da inoculação de explantes de folha com a linhagem 8196 de *Agrobacterium rhizogenes*. (B) calos de hissopo, 50 dias após serem retirados dos explantes. Esses calos foram obtidos a partir da inoculação de explantes de folha com a linhagem LBA de *Agrobacterium rhizogenes*.



Já os calos desenvolvidos a partir dos explantes inoculados com a linhagem 8196 apresentaram grande capacidade de multiplicação e elevada taxa de crescimento. Cerca de 14 meses após, os calos provenientes de explantes inoculados ainda apresentam elevado acúmulo de biomassa quando mantido em meio MS. Quando expostos à luz, os calos adquirem coloração esverdeada, o que mostra desenvolvimento de clorofila e pigmentos associados à fotossíntese.

LIU et al. (2002) observaram que a exposição de culturas de raízes geneticamente transformadas de *Artemisia annua* à luz aumentou a taxa de crescimento, bem como a produção e acúmulo de artemisina. Tanto a intensidade luminosa quanto o fotoperíodo são de grande importância. Quando o período luminoso foi de 16 horas seguidas de 8 horas de escuro o conteúdo de artemisina nos tecidos vegetais, com base no peso seco, foi de 1,8%. Esse valor foi diminuindo conforme se aumentou o período de escuro.

Calos se desenvolveram a partir dos explantes de folha de hissopo inoculados com a linhagem LBA, e apresentaram grande capacidade de multiplicação e elevada taxa de crescimento (Figura 2).

Esses resultados indicam que pode haver modificações na produção de metabólitos secundários pelas células vegetais ao se expor o tecido à luz.

Como pode ser observado na Tabela 7, a bactéria 17242 induziu a uma elevada taxa de necrose dos explantes, uma vez que esta bactéria apresentou elevada resistência ao antibiótico adicionado ao meio de cultura, estabelecendo com isso competição com o explante vegetal.

As raízes geradas a partir dos pontos de infecção foram transferidas para meio B5 ½ força iônica livre de hormônios e reguladores de crescimento, mas estas entraram em processo de senescência sem dar início ao crescimento.

Na Tabela 8 pode ser observado que, quando inoculadas em segmentos de caule de lavanda, as bactérias 8196 e A4 foram as únicas a induzir a formação de calos, sendo estes de rápido crescimento e grande volume. O mesmo pode ser observado para as outras espécies vegetais trabalhadas. A lavanda apresentou baixa formação de raízes em todos os tratamentos, inclusive no controle, sendo estas raízes ainda de comprimento reduzido e com lento crescimento.

Tabela 8 Respostas morfogenéticas apresentadas por explantes de segmentos de caule de lavanda, 20 dias após inoculação com diferentes linhagens selvagens de *Agrobacterium rhizogenes*.

Linhagens de <i>Agrobacterium</i>	Resposta Morfogenética (% de explantes de caule de lavanda)		
	Raiz	Calo	Necrose
8196	0	22	52
LBA	0	12	0
A4	0	19	48
17242	25	0	0
Controle	0	23	0

4.4 Inoculação com a Estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*

4.4.1 Inoculação de explantes de folha e segmentos de caule de hissopo.

Foi verificado o desenvolvimento de raízes no 15º dia após a inoculação dos explantes. As raízes se desenvolveram tanto a partir dos segmentos de caule como a partir de folhas (Figura 3).

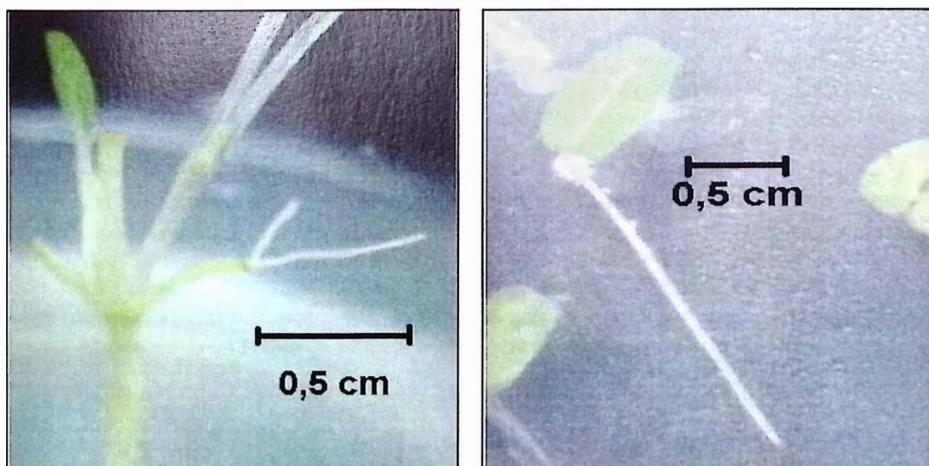


Figura 3: Raízes obtidas a partir de plantas de hissopo (*Hyssopus officinalis*) infectadas com *Agrobacterium rhizogenes* (R1601), 20 dias após inoculação (direita: segmento de caule; esquerda: segmento de folha).

Como pode ser observado na figura 4, os explantes controle não apresentaram formação de raízes nem de calo.

Aos 20 dias após a inoculação, as raízes obtidas foram transferidas para meio B5 ½ força iônica sólido e líquido, acrescido de 500 mg.L⁻¹ de cefotaxima sódica.

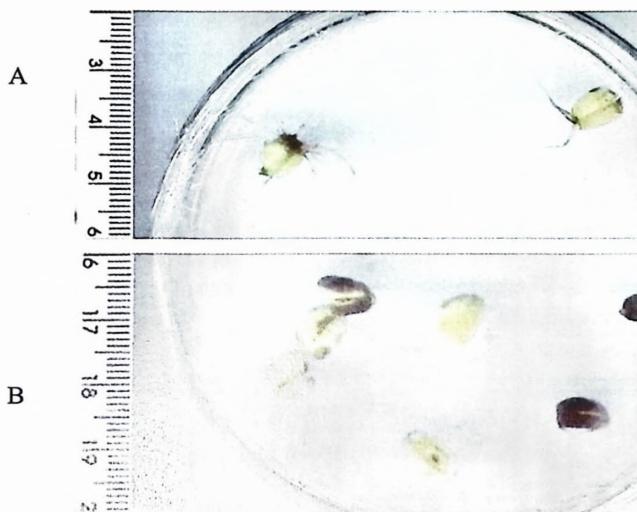


Figura 4 (A) Explantes de folhas de Hissopo inoculados com *Agrobacterium rhizogenes* (R1601). (B) Controle: explantes de folhas de Hissopo sem inoculação.

4.4.2 Estabelecimento e culturas clonais de raízes geneticamente transformadas de hissopo

As raízes retiradas dos explantes e transferidas para o meio B5 ½ força iônica sólido se desenvolveram na ausência de hormônios e reguladores de crescimento. Estabeleceu-se cultura de quatro clones (H1, H2, H3 e H4), originados de diferentes segmentos de raízes individualizados (Figura 5).

Os clones H1 e H2 apresentaram maior crescimento mais elevada quando comparados aos clones H3 e H4.

Morfologicamente, os clones de hissopo se mostraram muito semelhantes entre si, porém muito distintos dos clones de manjericão-roxo, manjericão verde e pimenta longa. As raízes primárias são finas, frágeis e completamente cobertas por finos pêlos.

Atualmente, as raízes já se encontram na 6^º repicagem e com 130 dias.

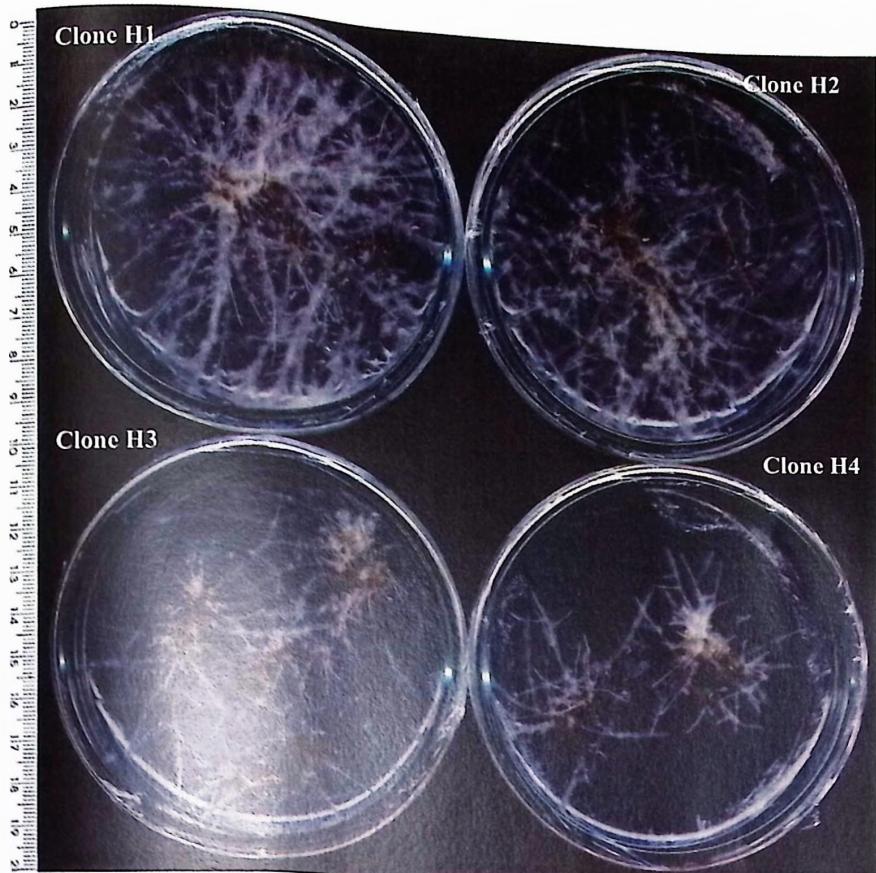


Figura 5 Culturas de raízes de hissopo, 37 dias após serem retiradas dos explantes (clones H1, H2, H3 e H4). Essas raízes foram obtidas a partir da inoculação de explantes de folha com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*.

4.4.3 Inoculação de explantes de manjericão-roxo var. Dark Opal e manjericão-verde var. Minete Anão.

As duas variedades de manjericão se apresentaram muito suscetíveis à infecção pela linhagem R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*. Para o manjericão-roxo var. Dark Opal, 100% dos explantes inoculados apresentaram o desenvolvimento de raízes a partir das lesões, enquanto que nos explantes não inoculados observou-se formação de raízes apenas em 45% dos explantes (Figura 6).

As raízes começaram a surgir, tanto nos explantes inoculados, quanto nos não inoculados, aos 15 dias após a montagem do experimento.

As raízes produzidas em todos os explantes inoculados de manjericão-roxo var. Dark Opal apresentaram morfologia, taxa e hábito de crescimento diferentes das raízes formadas a partir dos explantes não inoculados (Figura 6). As raízes formadas nos explantes inoculados eram mais espessas, de maior diâmetro, de crescimento mais

rápido e mais agressivo, sendo mais resistentes à manipulação. As raízes dos explantes não inoculados eram finas e frágeis.

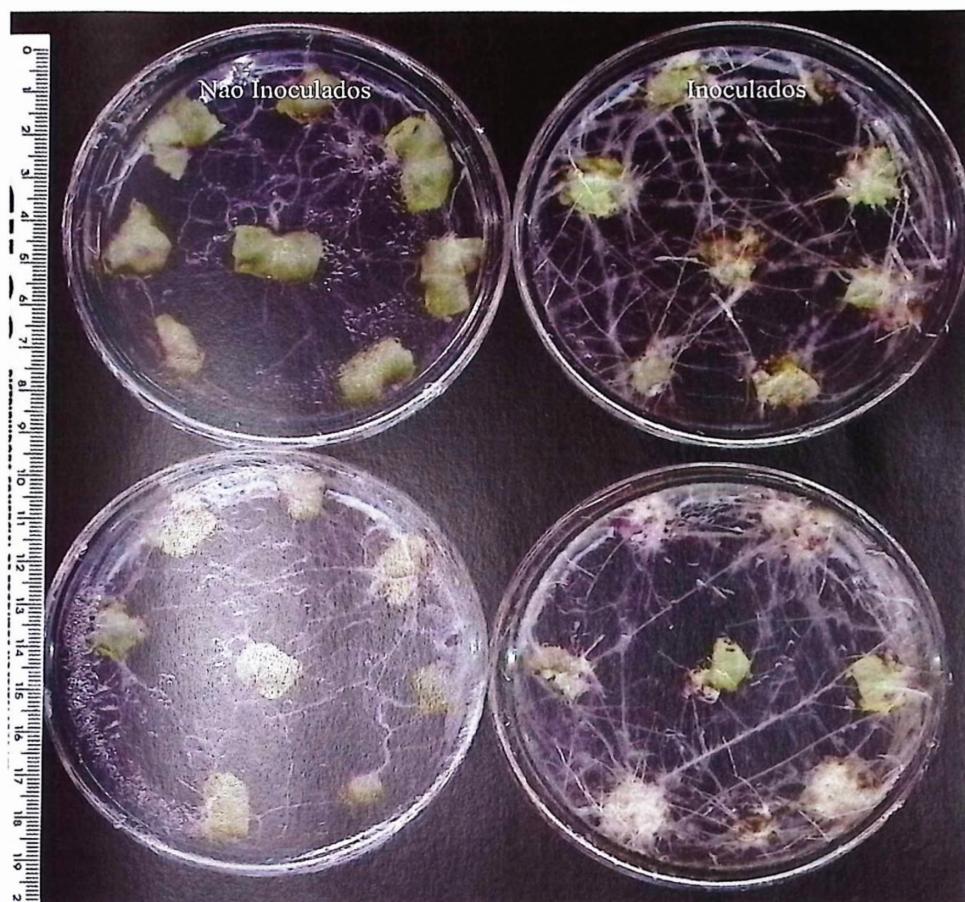
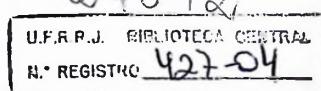


Figura 6 Explantes de manjericão-roxo inoculados com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes* e explantes de manjericão-roxo não inoculados, 20 dias após a inoculação.

Diferentemente do manjericão-roxo, para o manjericão-verde var. Minete Anão apenas os explantes inoculados com a linhagem R1601 de *Agrobacterium rhizogenes* apresentaram formação de raízes a partir das regiões lesionadas. Houve formação de raízes em 100% dos explantes inoculados e nenhuma produção de raízes nos explantes controle sem inoculação (Figura 7).



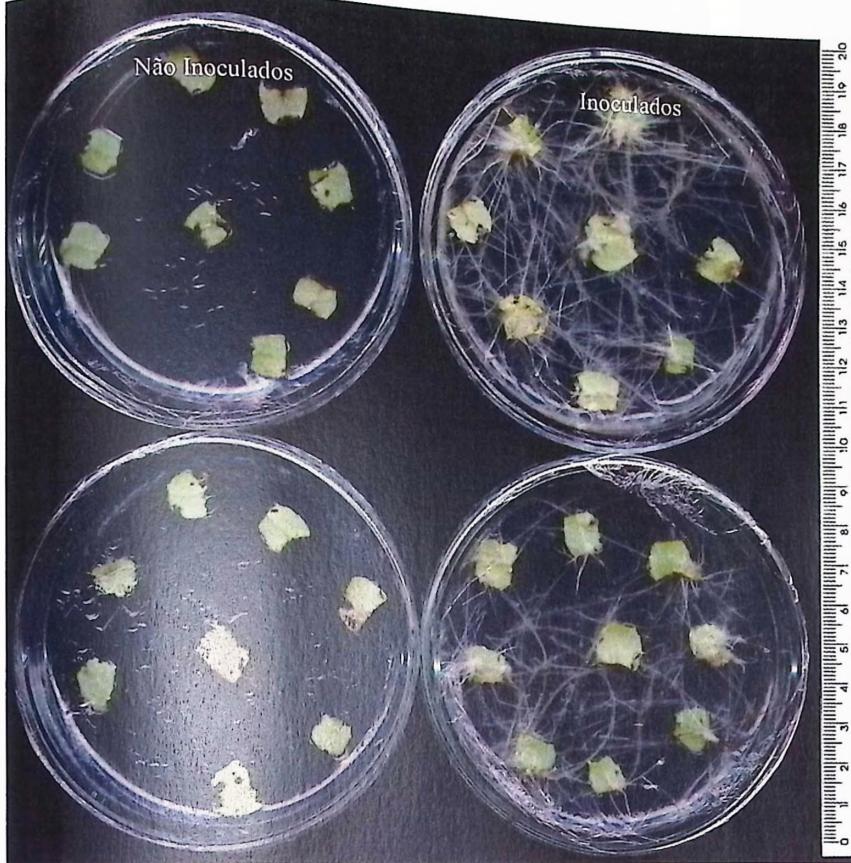


Figura 7 Explantes de manjericão-verde var. Minete Anão inoculados com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes* e explantes de manjericão-roxo não inoculados, 20 dias após a inoculação.

Essa diferença no comportamento das duas variedades demonstra profundas diferenças no comportamento morfogenético dos explantes de folha de manjericão cultivados *in vitro*. Enquanto o manjericão-roxo var. Dark Opal liberou raízes a partir de regiões lesionadas em 45% dos explantes controle, nenhum dos explantes controle de manjericão-verde var. Minete Anão produziu raízes.

Os explantes controle de manjericão-verde var. Minete Anão entraram em um rápido processo de senescência (20 dias após a montagem do experimento, 60% dos explantes apresentavam-se com elevada taxa de necrose ou amarelecimento). Isso não foi observado nos explantes inoculados.

Em nenhum dos explantes, tanto inoculados por agrobactéria quanto não inoculados, observou-se a formação de calos. A formação das raízes ocorreu de forma direta. Diferente do que foi observado nos explantes de folha inoculados com a linhagem selvagem de *Agrobacterium rhizogenes* 8196 (ver item 4.3).

TADA et al. (1996) observaram que a espécie *Ocimum basilicum* é suscetível também à infecção das linhagens ATCC 15834 e MAFF 03-01724 de *Agrobacterium rhizogenes*. Em experimentos *in vitro* de inoculação das duas linhagens em plântulas de manjericão, o surgimento das primeiras raízes a partir do sítio de infecção ocorreu três semanas após instalação do mesmo.

Outras espécies vegetais pertencentes à família Lamiaceae, como a *Salvia multiorrhiza* também se mostraram bastante suscetíveis a linhagens de *Agrobacterium rhizogenes*. Em experimento no qual se testou diferentes linhagens de *Agrobacterium rhizogenes* para infecção de explantes de folha de sálvia, constatou-se que dentre as linhagens testadas (A41027, TR105, R1601, ATCC 15834 e LBA 9402) a linhagem LBA 9402, que contém o plasmídio pRI 1855, é a melhor linhagem para induzir raízes transformadas nessa espécie vegetal (HU & ALFERMANN, 1993). Clones produzidos a partir das diferentes linhagens da bactéria também apresentaram diferenças na produção de diterpenos, bem como nos seu acúmulo nos tecidos.

4.4.4 Estabelecimento e culturas clonais de raízes geneticamente transformadas de manjericão-roxo var. Dark Opal e manjericão-verde var. Minete Anão

Culturas clonais de manjericão-roxo var. Dark Opal e de manjericão-verde var. Minete Anão foram estabelecidas a partir de segmentos individualizados que se formaram a partir dos sítios de infecção dos explantes de folha.

Raízes induzidas em segmentos de folha de manjericão co-cultivadas com a linhagem R1601 de *Agrobacterium rhizogenes* cresceram em meio livre de hormônios ou reguladores de crescimento, mostrando as características típicas de raízes transformadas geneticamente, tais como plagiotropismo, elevada taxa de crescimento e grande ramificação.

Para manjericão-roxo var. Dark Opal selecionou-se 8 clones, e para manjericão-verde var. Minete Anão selecionou-se 6 clones (Figuras 8 e 9). Foram escolhidos os segmentos radiculares de crescimento mais vigoroso quando ainda ligado ao explante.

Atualmente, as raízes já se encontram na 6^º repicagem e com 130 dias.

Os clones selecionados apresentaram características diferenciadas quanto ao crescimento e morfologia. Os clones MR1, MRS, MR6, MR8 e MR9 de manjericão-roxo var. Dark Opal apresentaram maior quantidade de pêlos radiculares bem finos. Os clones MR2, MR4 e MR7 apresentam menor densidade de pêlos finos (Figuras 8 e 9).

As raízes primárias do clone MR4 foram mais finas que nos demais clones.

O clone MR6 apresenta menor desenvolvimento, porém apresenta raízes primárias espessas recobertas de pequenos e finos pêlos.

Os clones MRS, MR6, MR7 e MR9 apresentaram eventual formação de pequenos calos, de coloração arroxeadas. OSKMAN-CALDENTEY et al. (1994) relataram diferenças similares em culturas clonais de *Hyoscyamus muticus*. Clones gerados pela linhagem LBA 9402 de *Agrobacterium rhizogenes* e pela linhagem C58CI pRTGUS104 apresentaram taxas de crescimento e estabilidade na produção de hiosciamina, os clones C58A apresentavam raízes mais grossas, curtas e ramificadas que os clones LBA1S. Além disso, os clones C58A apresentavam ocasionalmente a produção de calos.

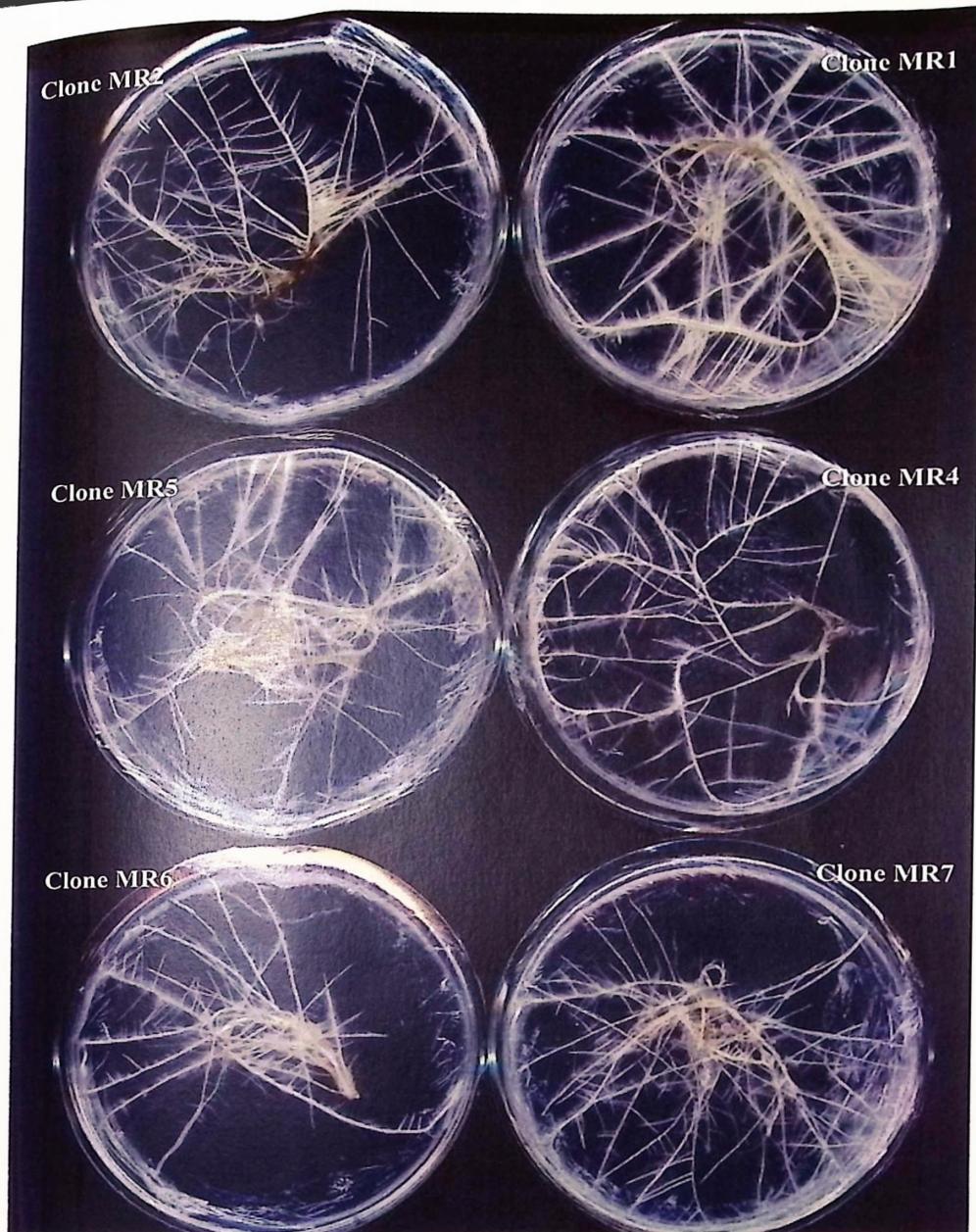


Figura 8 Culturas de raízes de manjericão-roxo var. Dark Opal, 37 dias após serem excisadas dos explantes (clones MR1, MR2, MR4, MR5, MR6 e MR7). Essas raízes foram obtidas a partir da inoculação de explantes de folha com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*.



Figura 9 Culturas de raízes de manjericão-roxo var. Dark Opal, 37 dias após serem excisadas dos explantes (clones MR8 e MR9). Essas raízes foram obtidas a partir da inoculação de explantes de folha com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*.

O estabelecimento de diferentes clones para as culturas transformadas é de grande importância quando se tem por objetivo a produção e acúmulo de metabólitos secundários (ARGÔLO et al., 2000), porém, quando se trata de uso para fitorremediação e outros a seleção de culturas clonais é dispensável (ARAÚJO et al., 2002).

YU et al. (1996) observaram que o comportamento de sete diferentes clones de *Solanum aviculare*, transformados pela estirpe A4 de *Agrobacterium rhizogenes* não diferiu quanto à taxa de crescimento e ao acúmulo de alcaloides. Porém, morfologicamente, os clones apresentaram variações consideráveis, ocorrendo variações inclusive na morfologia após serem replicadas de certos clones. Isso pode ser explicado pelo surgimento de pequenos nódulos calosos, que conferem certa instabilidade genética ao material vegetal.

Como pode ser observado na figura 10, todas as culturas clonais de manjericão-verde var. Minete Anão apresentaram formação de grande quantidade de pequenos e finos pêlos radiculares, apresentando de uma forma geral morfologia bem similar entre os clones. À exceção dos clones MV3 e MV6 que eventualmente produziram pequenos calos. Porém, diferente dos calos produzidos por alguns dos clones da var. Dark Opal, a coloração destes é branca.

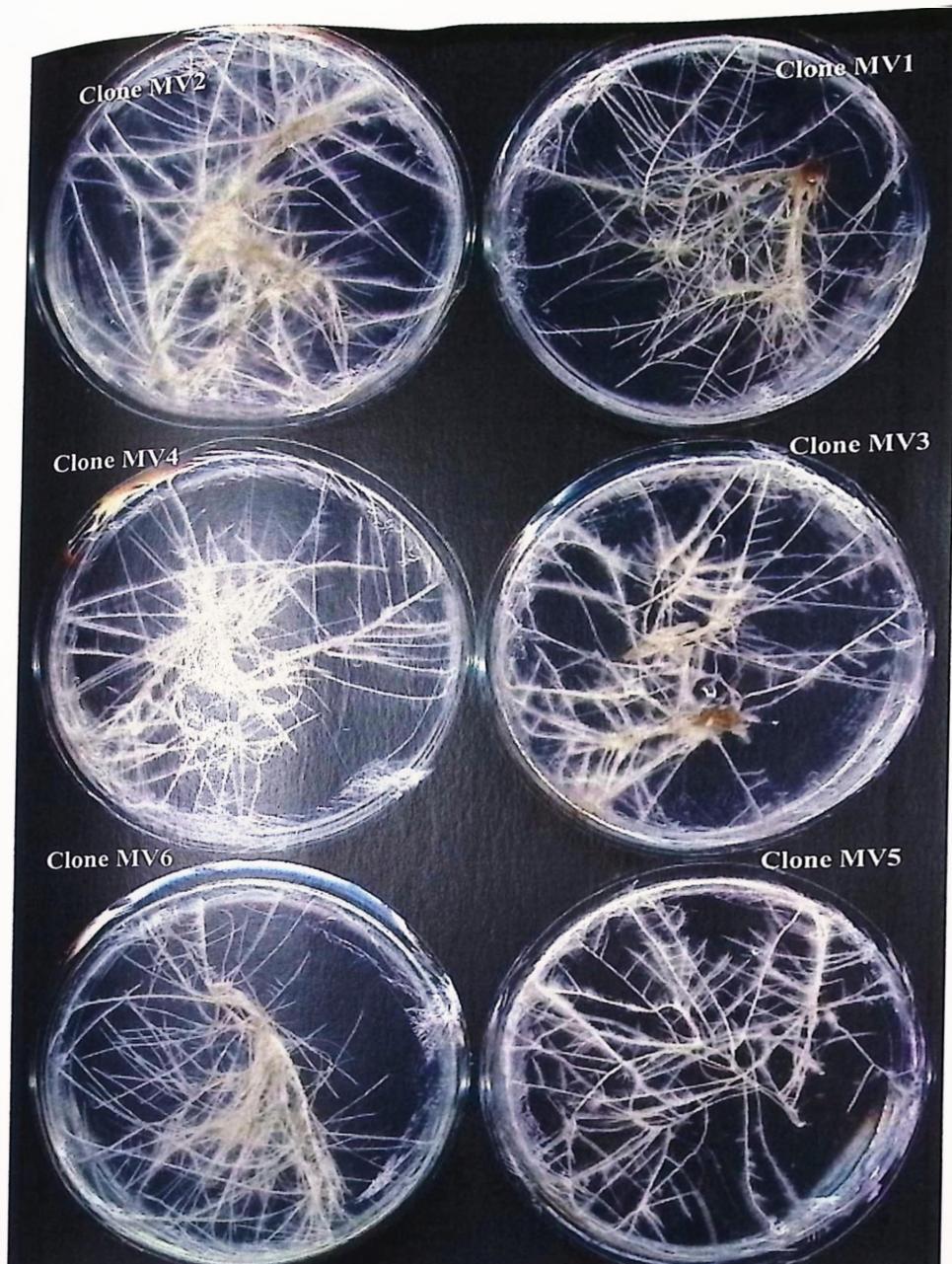


Figura 10 Culturas de raízes de manjericão-verde var. Minete Anão, 37 dias após serem excisadas dos explantes (clones MV1, MV2, MV3, MV4, MV5 e MV6). Essas raízes foram obtidas a partir da inoculação de explantes de folha com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*.

As culturas clonais de manjericão-verde var. Minete Anão apresentaram também as características típicas de culturas de raízes transformadas geneticamente por *Agrobacterium rhizogenes*, ou seja, rápido crescimento em meio de cultura livre de reguladores de crescimento (Figura 10).

BAIS et al. (2002) obtiveram diferentes culturas clonais de raízes de manjericão transformadas geneticamente pela linhagem ATCC-15834. Essas culturas clonais acumularam em média $65,1 \pm 4,8$ g.L⁻¹ de massa fresca, representando um acúmulo de massa fresca cerca de 6,51 vezes maior que culturas de raízes não transformadas. Foi observado também um maior acúmulo de ácido rosmarínico nos tecidos das raízes transformadas. Foi relatado que o ácido rosmarínico extraído de cultura de raízes transformadas de manjericão apresenta forte atividade biológica, inibindo o crescimento de fungos e bactérias.

4.4.5 Inoculação de explantes de pimenta-longa com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes* com e sem ácido sinapínico.

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. Para obtenção das plântulas utilizadas no processo de inoculação com *Agrobacterium* foram usados segmentos de caule de 1 cm, originados de plantas provenientes de sementes germinadas em meio MS ½ força iônica.

Esses segmentos de caule foram colocados em meio MS sólido, sendo colocados cerca oito segmentos por frasco contendo 35 mL de meio. 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. Isso demonstra a necessidade de geração 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 do explante. O mesmo não ocorreu com os explantes inoculados.

Na inoculação pela linhagem R1601 *Agrobacterium rhizogenes* a pimenta longa demonstrou ser a espécie de menor suscetibilidade à infecção, dentre as espécies trabalhadas. 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, 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 11).

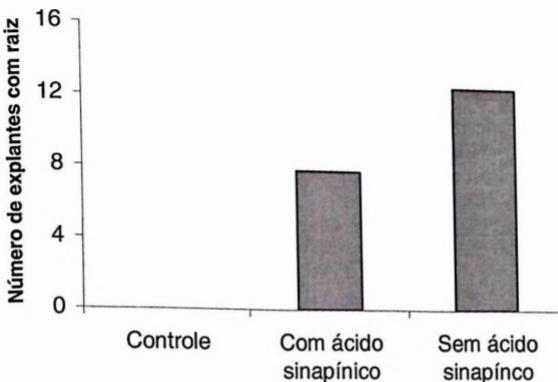


Figura 11 Número de explantes de folha de pimenta longa que produziram raízes quando inoculadas com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*, na presença ou ausência de 20 μ M de ácido sinapínico, 50 dias após inoculação.

Esses resultados contrariam a 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 (Joubert et al., 2002; Delmote et al., 1991; Spencer & Towers, 1988).

Hu & Alfermann (1993) observaram que o acréscimo de 20 μ M de acetosiringona ao meio de crescimento da linhagem R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*, aumentou de 10 para 33% a produção de raízes em explantes de folha de *Salvia miltiorrhiza*, em relação ao controle sem acetosiringona. Foi observado aumento significativo no número de explantes que produziram raízes em todas as linhagens testadas, à exceção da linhagem A4 1027. Segundo Stachel, et al. (1985) o ácido sinapínico apresenta efeito ativador da região *vir* de *Agrobacterium* muito similar ao da acetosiringona, quando administrados na mesma dose.

A dose de 20 μ M utilizada foi baseada em trabalhos com acetosiringona (Hu & Alfermann, 1993). Essa dose deve ser ajustada para o ácido sinapínico, para que se obtenha o efeito esperado.

4.4.6 Estabelecimento e culturas clonais de raízes geneticamente transformadas de pimenta longa.

A partir das raízes desenvolvidas nos explantes de folha foram estabelecidas três culturas clonais de pimenta longa: PL1, PL2 e PL3 (Figura 12). 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.

Morfologicamente os clones não se distinguem entre si. Apresentam coloração pardo-amarelada, crescimento mais lento que as raízes de hissopo e manjericão, bem

como ausência de pêlos mais finos recobrindo as raízes primárias e secundárias. As raízes primárias e secundárias são mais grossas e apresentam menor número de ramificações quando comparadas às outras espécies estudadas.

De uma forma geral, a morfologia das culturas clonais de ambas variedades de manjericão foi similar entre si, porém em nada se assemelharam às culturas clonais de hissopo (família Lamiaceae) e de pimenta longa (família Piperaceae). (Figuras 5, 8, 9 e 10, 12).

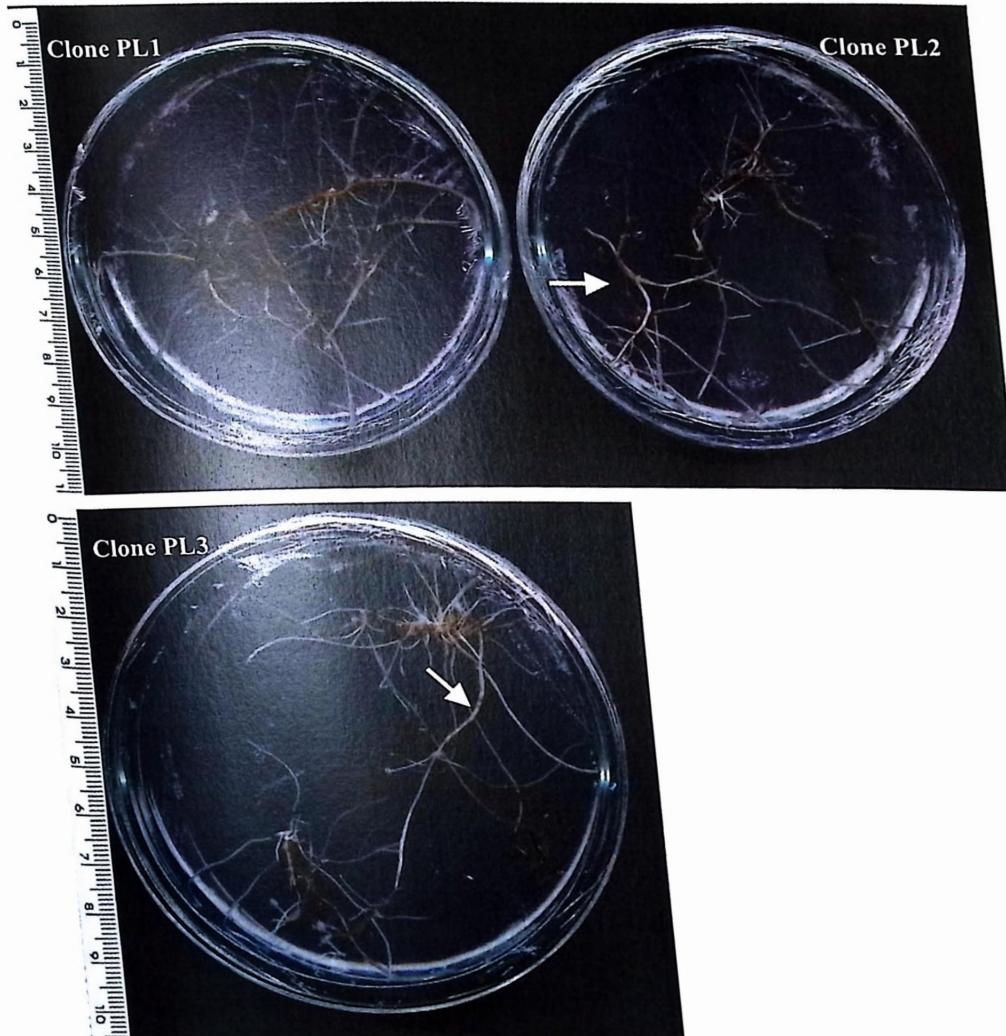


Figura 12 Culturas de raízes de pimenta longa, 120 dias após serem excisadas dos explantes (clones PL1, PL2 e PL3). Essas raízes foram obtidas a partir da inoculação de explantes de folha com a linhagem R1601 de *Agrobacterium rhizogenes*.

4.5 Caracterização de Transformação Gênica

Raízes foram eficientemente induzidas mediante a inoculação de explantes de hissopo, manjericão-roxo var. Dark Opal, manjericão-verde e pimenta longa com *Agrobacterium rhizogenes*, e expressaram o fenótipo típico de raízes pilosas (“hairy-roots”).

Para a avaliação 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 *nptII* que codifica a enzima Neomicina fosfotransferase II - *nptII*) (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998).

A amplificação do fragmento do gene *nptII*, nas amostras de raízes correspondentes, sugere a integração do T-DNA no genoma do hissopo, do manjericão-roxo var. Dark Opal, do manjericão-verde var. Minete Anão e da pimenta longa.

Pode ser notada a presença de bandas amplificadas para o controle positivo (plasmídio contendo o gene *nptII*) e para as amostras de raízes transformadas (Figura 13).

O gene *nptII* é o gene marcador de seleção mais utilizado em transformação genética de plantas. Ele codifica a enzima neomicina fosfotransferase II (NPT II), 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 aminoglicosados, como a canamicina, a neomicina, a geneticina e a paromicina, que assim são detoxificados por fosforilação (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998).

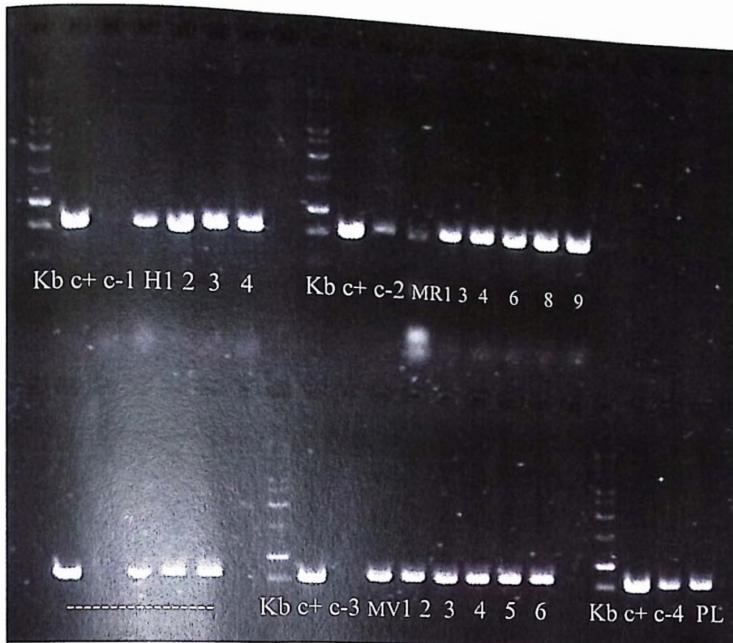


Figura 13 Análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do DNA de tecidos de manjericão-roxo var. Dark Opal, manjericão-verde, var. Minete Anão, hissopo e pimenta longa, usando primers para o gene *nptII*.

Legenda:

- Kb Marcador de peso molecular.
- C+ Plasmídio com gene *nptII*.
- C-1 DNA genômico de planta de hissopo não transformada.
- C-2 DNA genômico de planta de manjericão-roxo não transformada.
- C-3 DNA genômico de planta de manjericão-verde não transformada.
- C-4 DNA genômico de planta de pimenta longa não transformada.

H1 a H4 Clones de hissopo transformado.

MR1 a MR9 Clones de manjericão-roxo transformados.

MV1 a MV6 Clones de manjericão-verde transformados.

PL Clone de pimenta longa transformado.

----- Falhas de aplicação

4.6 Análise Qualitativa de Safrol

As análises dos perfis cromatográficos das amostras extraídas com *n*-hexano mostraram uma menor concentração (em % de área relativa) para o safrol, o que indicou a substituição do *n*-hexano por outro solvente de polaridade um pouco maior, o diclorometano, capaz de extrair o safrol com maior eficiência. Também foi feito um ajuste no tempo de extração do material por destilação, aumentando-o para uma hora e meia.

As análises dos perfis cromatográficos das amostras extraídas com diclorometano revelaram, por comparação de tempo de retenção com o padrão do safrol, que tanto a parte aérea quanto a raiz de plantas de pimenta longa cultivadas *in vitro*, apresentam concentração (% em área relativa) elevadas de safrol, quando comparados com os cromatogramas das análises feitas com *n*-hexano.

Resultados qualitativos dos perfis cromatográficos indicam a existência de safrol nas raízes de pimenta longa, com probabilidade de estar na mesma proporção à da parte aérea. Entretanto, novas análises serão necessárias, para quantificar o safrol presente na parte aérea e na raiz, para que uma comparação inequívoca possa ser feita.

5 CONCLUSÃO

As linhagens selvagens de *Agrobacterium rhizogenes* utilizadas neste trabalho não se mostraram infectivas para as espécies vegetais estudadas. No entanto, a inoculação com a estirpe R1601 de *Agrobacterium rhizogenes* permitiu a produção de raízes transformadas de Manjericão verde var. Minete anão, Manjericão roxo var. Dark opal, Hissopo e Pimenta longa. Foram obtidas culturas clonais das raízes transformadas, indicando potencial de uso para estudos de produção de metabólitos de interesse.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A implementação do cultivo *in vitro* a partir de sementes comerciais ou não, permitiu o desenvolvimento de protocolo específico de assepsia. Desta maneira, tornou-se possível a produção de plântulas a partir de sementes *in vitro*. Para a pimenta longa (*Piper hispidinervium*), no entanto, observou-se um crescimento muito lento das plântulas obtidas de sementes, de modo que propomos, a partir dos resultados obtidos nessa tese, a regeneração de plântulas a partir de explantes. Os protocolos gerados são inéditos para esta espécie.

Os resultados de lento crescimento da pimenta longa *in vitro* e *in vivo*, respaldaram nossos esforços para a produção de raízes transformadas dessa planta, grande produtora do óleo essencial safrol, muito importante para a indústria e que atualmente, é isolado de material vegetal, de plantios comerciais. As raízes transformadas de pimenta longa apresentaram crescimento mais lento em relação a cultura de raízes de outras espécies, mas apresentou potencial de maior acúmulo de biomassa que plantas inteiras crescendo *in vitro*.

Algumas linhagens de *Agrobacterium rhizogenes* que foram utilizadas neste projeto apresentaram respostas em termos de desenvolvimento de raízes transformadas, sendo a linhagem R1601 a de melhor desempenho, pois apresentou maior virulência e diversidade de hospedeiros. No entanto, não se pode excluir as bactérias que não apresentaram resposta favorável, uma vez que a produção de compostos fenólicos em vegetais após ferimento, pode não ser suficiente para induzir a expressão da região *vir* do plasmídio *Ri* das *Agrobacterium rhizogenes*. A região *vir* codifica proteínas responsáveis pela transferência do T-DNA e produção de raízes transformadas geneticamente. Deste modo, o ácido sinapínico, um composto fenólico, poderia aumentar a infecção bacteriana e transformação gênica necessária à produção de raízes transformadas. Entretanto a dose de 20 μM utilizada não aumentou a taxa de infecção de explantes de folhas de pimenta longa, conforme hipotetizado.

A linhagem selvagem 8196 se mostrou capaz de induzir a formação de calos nas diversas espécies vegetais testadas. Esses calos mostraram habilidade de crescer em meio livre de hormônios e reguladores de crescimento, o que pode ser promissor na produção de metabólitos secundários por essas espécies vegetais.

As culturas clonais de raízes transformadas de manjerião-roxo var. Dark Opal, manjerião-verde Minete Anão e hissopo apresentaram grande capacidade de crescer *in vitro*, com elevada taxa de crescimento, plagiotropismo e grande capacidade de regeneração.

Uma vez que se conhece que as várias espécies de manjerião são ricas em muitas substâncias de interesse, como ácido rosmarínico (éster do ácido caféico, usado como antioxidante) e seu valioso óleo essencial (rico em linalol e mentol), essas raízes podem ser utilizadas no estudo das condições ambientais que modulam a produção, biossíntese e acumulação nos tecidos, dessas substâncias.

O manjerião-roxo var. Dark Opal demonstrou grande habilidade na produção de raízes também a partir de explantes não-inoculados. Essas raízes apresentaram capacidade de crescer em meio B5 $\frac{1}{2}$ força iônica líquido, mas não em meio sólido, livre de reguladores de crescimento, quando retiradas dos explantes. Este fenômeno ainda não havia sido relatado na literatura.

O hissopo, por sua vez, é uma planta medicinal de grande valor, pois apresenta atividade anti-viral. Suas raízes apresentam potencial para produzir ácido rosmarinico e outros compostos característicos da família Lamiaceae, o que deve ser explorado quando da utilização de cultura de suas raízes transformadas geneticamente.

A continuidade desse trabalho é essencial para que seja possível conhecer melhor todos os fatores envolvidos na manipulação *in vitro* das espécies estudadas. Todas as espécies vegetais apresentam considerável valor econômico, social e ecológico, o que justifica aplicação da biotecnologia na tentativa de se racionalizar a exploração desses recursos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, C., Plants from *Agrobacterium rhizogenes* tumors on *Nicotiana tabacum*. *Plant Science Letters*, vol. 8, 23-30 pp., 1977.
- AMBROS, P. F., MATZKE A. J. M. & MATZKE, M. A. Localization of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in plant chromossomes by insitu hibridization. *Embo Journal*, v. 5, n. 9, 2073-2077 pp. 1986.
- AOKI, T.; MATSUMOTO, H.; ASAOKO, Y.; MATSUNAGA, Y. & SHIMOMURA, K. Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15384. *Plant Cell Reports*, 16, p. 282 – 286. 1997.
- ARAÚJO, B. S.; CHARLWOOD, B. V. & PLETSCH, M. Tolerance and metabolism of phenol and chloroderivatives by hairy root cultures of *Daucus carota* L. *Environmental Pollution*, V. 117, 329-335 pp. 2002.
- ARGÔLO, A. C. C.; CHARLWOOD, B. V. & PLETSCH, M. The regulation of solasodine production by *Agrobacterium rhizogenes* – transformed roots of *Solanum aviculare*. *Planta Medica*. V. 66, 448-451 pp. 2000.
- BAIS, H. P.; WALKER, T. S.; SCHWEIZER, H. P. & VIVANCO, J. M. root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 40, 983-995 pp. 2002.
- BENSADDEK, L.; GILLET, F.; SAUCEDO, J. E. N. & FLINIAUX, M. A. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots, vol. 85 (1), p. 35 – 40. 2001.
- BERBARA, R.L.L., MORRIS, B.M., FONSECA, H.M.A., GOW, N.A.R., DAFT, M.J. Eletrical currents associated with arbuscular mycorrhizal interactions. *New Phytologist*. Great Britain, v. 129, p. 433-38, 1995.
- BHADRA, R., VANI, S. & SHANKS, J. V. Production of indole alkaloids by selected hairy roots lines of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 41, p. 581 – 592. 1993.
- BRASILEIRO, A. C. M. Cultivo e conservação de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. (Editores). *Manual de Transformação Genética de Plantas*, Embrapa-SPI / Embrapa-Cenargen, p. 65 – 74. 1998.
- BRASILEIRO, A. C. M. & LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. (Editores). *Manual de Transformação Genética de Plantas*, Embrapa-SPI / Embrapa-Cenargen, p. 74 – 92. 1998.
- BRASILEIRO, A. C. M. & LACORTE, C. *Agrobacterium*: um sistema natural de transferência de genes para plantas. *Biotecnologia e Desenvolvimento*, p. 12 – 15. 2001.
- CAPONE, I., SPANO, L.; CARDARELLI, M.; BELLINCAMPI, D.; PETIT, A. & CONSTANTINO, P. Induction and growth properties of carrot discs with different complements os *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Molecular Biology*, v. 13, 43-52 p. 1989.
- CARDARELLI, M.; SPANO, L.; MARIOTTI, D.; MAURO, M. L.; VAN SLUYS, M. A. & CONSTANTINO, P. The role of auxin in hairy root induction. *Molecular General Genetics*, v. 208, 457-463 p. 1987.

- CIAU-UITZ, R.; MIRANDA-HAM, M. L.; COELLO-COELLO, J.; CHÍ, B.; PACHECO, L. M. & LOYOLA-VARGAS, V. M. Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. In vitro Cell. Dev. Biol., 30, p. 84 – 88. 1994.
- COSTA, A. F. Farmacognosia, 3 ed., Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. V. 1, 835 p. 1986.
- CRAWLEY, M. J. Life history and environment. In: CRAWLEY, M. J. (Editor) Plant Ecology, Blackwell Science Ltd, second edition, p. 73 – 131. 1997.
- DE CLEENE, M. & DE LEY, J. The host range of infectious hairy-root. The Botanical Review, vol. 47, 147-194 pp., 1981.
- DELLAPORTA, M.; WOOD, J. E HICKS, J.B. - A Plant DNA Minipreparation: Version II. Plant Mol. Biol. Rep 1: 19-21. 1989.
- DELMOTTE, F. M.; DELAY, D.; CIZEAU, J., GUERIN, B. & LEPLE, J. C. *Agrobacterium vir-* inducing activities of glycosylated acetosyringone, acetovanillone, syringaldehyde and syringic acid derivatives, Phytochemistry, vol. 30, n° 11, 3549-3552 pp. 1991.
- DESSAUX, Y.; PETIT, A. & TEMPE, J. Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. Phytochemistry, vol. 34, n. 1, p. 31 – 38. 1993.
- DORNENBURG, H. & KNORR, D. Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. Food Technology, 51:47, 48, 51-52, 54. 1997.
- ELISABETSKY, E. & WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. Journal of Ethnopharmacology, Amsterdã, v. 38, p. 137-143, 1993.
- FARNSWORTH, N. R., THANAKORNKIT, B. L., CHE, C. T. & FONG, H. H. S. Constituents of *Croton crassifolius* roots. Planta Medica, v. 1, 61-63 pp. 1988.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2^a. ed. Brasília: EMBRAPA CENARGEN, 1995. pp. 220.
- FIGUEIREDO, A. C., PAIS, M. S. S. & SCHEFFER, J. J. C. Plant Cell, Tissue and Organ Cultures, n. 40, 113. 1995.
- FLORES, H. E.; HOY, M. W. & PICKARD, J. J. Secondary metabolites from root cultures. Trends Biotechnology, vol. 5 p. 64 – 68. 1987.
- FLORES, H. E. & CURTIS, W.R. Approaches to Understanding and Manipulating the Biosynthetic Potential of Plant Roots. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 665, p. 188-209, 1992.
- FLORES, H. E. et al. Biotransformation of butylated hydroxytoluene in hairy root cultures. Plant Physiol. Biochem. 32:511-519. 1994.
- FLORES, H. E., WEBBER, C. & PUFFETT, J. Underground metabolism: the biosynthetic potential of roots. In.: WAISEL, Y. ET AL. (Eds.) Roots: The Hidden Half, (2^o Ed.), 931-956 pp. 1996.
- FLORES, H.E.; VIVANCO, J.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. Trends in Plant Sci. 4(6): 220-226. 1999.
- FREIRE, M. F. I. Ação antifúngica de *Vernonia scorpioides*, *Vernonia sericea* *Vernonia diffusa* (Asteraceae): Ensaios de Antibiose e Toxidez. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 64 p. Tese M. S. 1995.
- GEORGE, U. H. E. CO INC – Market Report, Nova Jersey, EUA. 1995.

GIRI, N. & NARASU, M. L.; Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, vol. 18, p. 1 – 22. 2000.

GOODOY-HERNÁNDEZ, G. & LOYOLA-VARGAS, V. M. Effect of fungal homogenate, enzyme inhibitors and osmotic stress on alkaloid content of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, v. 10, 537-540 pp. 1991.

GOLLAPUDI S.; SHARMA H.A. & AGGARWAL S. Isolation of a previously unidentified polysaccharide (MAR-10) from *hyssop officinalis* that exhibits strong activity against human-immunodeficiency-virus type-1. *Biochemistry and Biophysical Research*, 210: (1) 145-151. 1995.

GOTTLIEB, O. *Micromolecular Evolution, Sistematics and Ecology*. Berlin: Springer-Verlag, 1982.

GOTTLIEB, O. & KAPLAN, M. A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. *Ciência Hoje*, Rio de Janeiro, v. 15, n. 89, p. 51-4, abr. 1993.

HARBORNE, J. B. *Plant Secondary Metabolism*. In: CRAWLEY, M. J. (Editor) *Plant Ecology*, Blackwell Science Ltd, second edition, p. 132 – 155. 1997.

HERRERA-ESTRELLA, L.; DEPICKER, A.; VAN MONTAGU, M. & SCHELL, J. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid derived vector. *Nature*, v. 303, 160-163 p. 1993.

HU, Z. B. & ALFERMANN, A. W. Diterpenóide production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, v. 32, n. 3, 699-703 pp. 1993.

INZÉ, D.; FOLLIN, A.; VAN LIJSBETTENS, M; SIMOENS, C.; GENETELLO, C.; VAN MONTAGU, M. & SCHELL, J. Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; futher evidences that two genes are involved in indole-3-acetic acid production. *Molecular General Genetics*, v. 194, 265 p. 1984.

JAZIRI, M.; YOSHIMATSU, K.; HOMES, J. & SHIMOMURA, K. Traits or transgenic *Atropa belladonna* doubly transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultures*, 38: 257-262 pp. 1994.

JOUBERT, P.; BEAUPÈRE, D.; LELIÈVRE, P.; WADOUACHI, A.; SANGWAN, R. S. & SANGWAN-NORREEL, B. S. Effects of phenolic compounds on *Agrobacterium vir* genes and gene transfer induction – a plausible molecular mechanism of phenol binding protein activation. *Plant Science* 162, 733-743 pp., 2002.

KENNEDY, A. I.; DEANS, S. G.; SVOBODA, K. P.; GRAY, A. L. & WATERMAN, P. G. Volatile oils from normal and transformed root of *Artemisia absinthium*. *Phytochemistry*, v. 32, n. 6, 1449-1451 pp. 1993.

KOMARI, T.; HALPERIN, W. & NESTER, E. W. Physical and functional map supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumor-indicing plasmid pTiBo542. *Journal of Bacteriology*, v. 166, 88-94 pp. 1986.

KOCHAN, E.; WYSOKINSKA, H; CHRNIEL, A. & GRABIAS, B. Rosmarinic acid ande other phenolis acids in hairy roots of *Hyssopus officinalis*. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences*, 54 (1-2), p. 11 – 16. 1999.

KRIKORIAM, A. D. & BERQUAM, D. L. Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. *Botanical Review*, v. 35, 59-88 pp. 1969.

KRÓLICKA, A.; STANISZEWSKA, I.; BIELAWSKI, K.; MALINSKI, E.; SZAFRANEK, J. & LOJKOWSKA, E. Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. *Plant Science*, v. 160, 2, 259-264 pp. 2001.

KUZOVKINA, I. N. Cultivation of genetically transformed plants roots: possibilities and prospects for use in plant physiology. Soviet Plant Physiology, vol. 39, n. 6, part. 2. 1992.

LAWRENCE, B. M. Labiate oils – mother nature's chemical factory, In: Essential oils, Allured Publishing, Carol Stream, p. 188-206, 1993.

LAZUTKA, J. R., MIERAUSKIENE, J., SLAPSYTÉ, G. & DEDONITÉ, V. Genotoxicity of Dill (*Anethum graveolens*), peppermint (*Mentha X piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in humanes lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology, 29, 485-492 pp. 2001.

LEWINSOHN, E., ZIV-RAS, I., DUDAI, N., TADMOR, Y., LASTOCHKIN, E., LARKOV, O., CHAIMOVITSH, D., RAVID, U., PUTIEVSKY, E., PICHERSKY, E. & SHOHAM, Y. Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Developmental and chemotypic association of allylphenol *O*-methyltransferase activities. Plant Science, v. 160, 27-35 pp. 2000.

LI, W.; ASADA, Y.; KOIKE, K.; HIROTAMI, M.; RUI, H.; YOSHIKAWA, T. & NIKAIKO, T. Flavonoids from *Glycyrriza pallidiflora* hairy root cultures. Phytochemistry, v. 58, 595-598 pp. 2001.

LIU, C.; GUO, C.; WANG, Y. & OUYANG, F. Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis or *Artemisia annua* L. Process Biochemistry, v. 38, 581-585 pp. 2002.

LOURENÇO, P. M. L.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; OLIVEIRA, M. M.; DEANS, S. G. & SCHEFFER, J. J. C. Essential olis from hairy roots cultures and from plants roots of *Achillea millefolium*. Phytochemistry, 51, 637-642 pp. 1999.

LOURENÇO, P. M.; CASTRO, S.; MARTINS, T. M.; CLEMENTE, A. & DOMINGOS, A. Growyh and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. Enzyme and Microbial Technology, v. 31, 242-249 pp. 2002.

LUCZKIEWICZ, M., ZÁRATE, R., DEMBINSKA-MIGAS, WANDA, MIGAS, P. & VEEPORTE, R. Production of pulchelin E in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L. Plant Science, 00, 1-10 pp. 2002.

MAHAGAMASEKERA, M. G. P. & DORAN, P. M. Intergeneric co-culture of genetically transfromed organs for the production of scopolamine. Phytochemistry, v. 41, n. 1, 17-25 pp. 1998.

MALDONADO-MENDOZA, I. E.; AYORA-TALAVERA, T. & LOYOLA-VARGAS, V. M. Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium* – Characterization and stability of tropana alkaloid during long periods of subculturing. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, vol. 33, p. 321 – 329. 1993.

MALLOL, A.; CUSIDÓ, R. M.; PALAZÓN, J.; BONFILL, M; MORALES, C. & PIÑOL, M. T. Ginsenoside production in different phenotypes of *Panax ginseng* transformed roots. Phytochemistry 57, p. 365-371. 2001.

MARTINS, G. L.; DANIEL, M. C.; CASTELLANI, D. G. & DIAS, J. E. Plantas Medicinais. Viçosa: UFV. Imprensa Universitária, 220 p. 1994.

MORENO-VALENZUELA, O.; COELLO-COELLO, J; LOYOLA-VARGAS, V. M. & VÁZQUEZ-FLOTA, F. Nutrient consumption and alkaloid accumulation in hairy root line of *Catharanthus roseus*. Biotechnology Letters, vol. 21, p. 1017 – 1021. 1999.

- MOYANO, E.; FORNALÉ, S.; PALAZÓN, J.; CUSIDÓ, R. M.; BONFILL, M. MORALES, C. & PIÑOL, M.T. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in *Solanaceae* plants. *Phytochemistry*, 52, 1287 – 1292 pp. 1999.
- NICOMEDES JÚNIOR, J., PATERNOSTRO, H. G., DOBBSS, L. B., SOUZA, S. R. Avaliação do uso de extratos de arruda (*Ruta graveolens* L) sobre o crescimento miscelial de fitopatógenos de solo (*Sclerotium rolfsii* e *Fusarium oxysporum*) In: FERTBIO 2000, 2000, Santa Maria. Resumos da XXIV Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição Mineral de Plantas, v.1. 62 p. 2000.
- NICOMEDES JÚNIOR, J., SOUZA, S. R., STARK, E. M. L. M., SOUZA, M. A. A. Atividade fungicótica de soluções provenientes de bulbos frescos de *Allium sativum* e alterações no metabolismo em plantas de tomateiros. In: XI Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ, 2001, Seropédica. Anais da XI Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ - Trabalhos completos. Seropédica: Editora da Universidade Rural, v.11, 29 – 32. 2001.
- NUSSBAUMER, P.; KAPÉTANIDIS & CHRISTEN, P. Hairy roots of *Datura candida* x *D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloids biosynthesis. *Plant Cell Reports*, vol. 17, p. 405 – 409. 1998.
- OKSMAN-CALDENTEY, K. M. & HILTUNEN, R. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. *Field Crops Research*, 45, p. 57 – 69, 1996.
- OKSMAN-CALDENTEY, K. M.; SEVÓN, N.; VANHALA, L. & HILTUNEN, R. Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *Hysocyamus muticus*. *Plant Cell, Tissue and Culture*, vol. 38, p. 263 – 272. 1994.
- PEREIRA, A. M. S., BERTONI, B. W., CARLOS, R. N. & FRANÇA, S. C. Cultura de calos de *Piper* para a produção de micromoléculas bioativas. *Horticultura Brasileira*, v. 18, suplemento julho. 2000.
- PESCADOR, R.; ARAÚJO, P. S., MAAS, C. H., REBELO, R. A., GIOTTO, C. R., WENDBAUSEN JR., R., LARGURA, G. & TAVARES, L. B. B. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – pimenta longa. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, n 15. 2000.
- PHYTHOUD, F.; SINKAR, V. P., NESTER, E. W. & GORDON, M. P. Increased virulence of *Agronacterium rhizogenes* conferred by the *vir* region of pTiBo542: application to genetic engineering of poplar. *Biotechnology*, v. 5, 1323 – 1327 pp. 1987.
- PLETSCH, M. Compostos Naturais Biologicamente Ativos – A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. *Biotecnologia, Ciência e Vida*. 2001.
- PRINCIPE, P. P. The economic significance of plants and their constituents as drugs. In: WAGNER, H.; HIKINO, H. & FARNSWORTH, N. R. (Editores), *Economic and Medicinal Plant Research*, 3. Academic Press, London, pp. 1 – 17.
- RAO, S. R. & RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* (20), 101-153 pp. 2002.
- ROSA, F.A.F.; NASCIMENTO, M.G.; REBELO, R.A.; PESCADOR, R. Avaliação da atividade regulatória de crescimento de compostos análogos ao ácido indolacético em sementes de alface. In: 23^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Livro de Resumos, v.2, QB-010, Poços de Caldas, 2000.
- SANTOS, M. H.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, J. R.; QUEIROZ, M. E. L. R.; LIMA, R. D. Efeito de constituintes químicos extraídos do fruto de *Rheedia*

gardneriana (bacupari) sobre bactérias patogênicas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Vol. 32, n. 2, jul/dez., 297-301 pp. 1999.

SANTOS, P. M., FIGUEIREDO, A. C., OLIVEIRA, M. M., BARROSO, J. G., PEDRO, L. G., DEANS, S. G., YOUNUS, A. K. M. & SCHEFFER, J. J. Essential oils from hairy root cultures of *Pimpinella anisum*. Phytochemistry, 48, n. 3, 455-460 pp. 1998.

SAUERWEIN, M.; WINK, M. & SHIMOMURA, K. Influence of light and phytohormones on alkaloid production in transformed root cultures of *Hysocymus albus*. Journal of Plant Physiology, vol. 140, p. 147 – 152. 1992.

SAVARY, B. J. & FLORES, H. E. Biosynthesis of defense-related proteins in transformed root cultures of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. Var. *japonicum* (Kitam.) Plant Physiology, v. 106, 1195-1204 pp. 1994.

SEABRA, R.; AREIAS, F.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. & FERRERES, F. Caracterização dos extratos de salvia pelo perfil fenólico. Horticultura Brasileira, v. 18, suplemento. 2000.

SHENG, J. & CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. Plant Cell, v. 8, n. 19, 1699-1710 pp. 1996.

SHIMOMURA, K.; SUDO, H.; SAGA, H. & KAMADA, H. Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Cell Reports, v. 10, 282-285 pp. 1991.

SILVA, E. S. A., NETO, O. G. R., FIGUEIREDO, F. J. C. Respostas biofísicas, alocação de biomassa e produção de óleo essencial de pimenta longa no município de Igarapé-Açu, PA. Horticultura Brasileira, v. 18, suplemento julho. 2000.

SIMIONATTO, E.L.; REBELO, R.; RAMOS, M.G.; ZANETTE, V.C. Fontes alternativas de safrol – propagação da pimenta longa pela técnica de estaquia. FNMA, processo anterior n. 1668/92 referente ao Convênio Anterior n.058/95, 1997.

SLUYS, M. A. V.; TEMPÉ, J. Behavior of the maize transposable element activator in *Daucus carota*. Molecular general Genetics, v. 219, 313-319 p., 1989.

SLUYS, M. A. V. *Agrobacterium*: um vetor natural para transformação em plantas. In.: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília, Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH, 2 vl., 510, 354 p. 1999.

SPENCER, P. A. & TOWERS, G. H. N. Specificity of signal compounds detected by *Agrobacterium tumefaciens*. Phytochemistry, vol. 27, n° 9, 2781-2785 pp. 1988.

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, vol. 318 19/26, 624-629 pp. 1985.

SUBROTO, M. A. & DORAN, P. M. Production of steroid alkaloids by hairy roots of *Solanum aviculare* and the effect of gibberellic acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, vol. 38, p. 93 – 102. 1994.

TEIXEIRA, S. L. & TORRES, A. C., Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas. In.: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas, vol. 1, Brasília, EMBRAPA – SPI, 864p. 1998.

TADA, H.; MURAKAMI, Y; OMOTO, T.; SHIMOMURA, K. & ISHIMARU, K. Rosmarinic acid and related phenolics in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. Phytochemistry, vol. 42, n. 2, p. 431 – 434. 1996.

TANAKA, O. & KASAI, R. Saponins of ginseng and related plants. In: HERZ, W., GRISEBACH, H., KIRBY, G. W. & TAMM, Ch. (Eds.), *Progress in the Chemical Organic Natural Products*, Vol. 46. Springer-Verlag, Berlin, 1-76 pp. 1984.

TEPFER, D. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiology Plantarum*, vol. 79, p. 140 – 146. 1990.

VÁZQUEZ-FLOTA, F.; MORENO-VALENZUELA, O.; MIRANDA-HAM, M. L.; COELLO-COELLO, J. & LOYOLA-VARGAS, V. M. Catharanthine and ajmalicine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures – medium optimization and elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 38, p. 273 – 279. 1994.

VIEIRA, L. S. *Fitoterapia da Amazônia: Manual de Plantas Medicinais*. 2^ª Edição. São Paulo. Agronômica Ceres. 347 p. 1992.

WALTON, N. J. & McLAUCHLAN, W. R. Diamine oxidation and alkaloid production in transformed root cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, v. 29, n. 5, 1455-1557 pp. 1990.

WANDER, J. G. N. & BOUWMEESTER, H. J. Effects of nitrogen fertilization on dill (*Anethum graveolens* L.) seed and carvone production. *Industrial Crops and Products*, v. 7, 211-216 pp. 1998.

YU, S.; KWOK, K. H. & DORAN, P. M. Effect of sucrose, exogenous product concentration, and other culture conditions on growth and steroid alkaloid production by *Solanum aviculare* hairy roots. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 18, p. 238 – 243. 1996.

ZAMBRYSKI, P.; JOOS, H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M & SCHELL, J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO Journal*, v. 2, p. 2143 – 2150, 1983.

ZAMBRYSKI, P. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annual Review of Plant Physiology and Plant molecular Biology*, v. 43, 465-490 pp. 1992.

ZENK, M. H. Chasing the enzymes of secondary metabolism: plant cultures as a pot of gold. *Phytochemistry*, 30, 3864 – 3874 pp. 1991.

ANEXO

Composição dos meios de cultura para crescimento de *Agrobacterium rhizogenes*:

Meio YMB (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998)

Extrato de levedura	400 mg.L ⁻¹
Manitol	10000 mg.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	500 mg.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	200 mg.L ⁻¹
NaCl	100 mg.L ⁻¹
pH	6,8

Para meio sólido, acrescentar ágar 1,0% p/v.

Meio Rhizo

Extrato de levedura	5,0 g.L ⁻¹
Caseína hidrolisada	0,5 g.L ⁻¹
Manitol	8,0 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g.L ⁻¹
NaCl	5,0 g.L ⁻¹
pH	6,6 a 6,8
Canamicina	0,1 g.L ⁻¹
Ampicilina	0,1 g.L ⁻¹

Composição dos meios de cultura utilizados para crescimento de plantas e de raízes transformadas de diferentes espécies vegetais e germinação de sementes.

Composição	Constituinte (mg/L⁻¹)	Meio MS ½ força	Meio B5 ½ força
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	825	---
	KNO ₃	950	1.250
	(NH ₄) ₂ SO ₄	---	67
	CaCl ₂ .2H ₂ O	220	75
	MgSO ₄ .7H ₂ O	185	125
	KH ₂ PO ₄	85	---
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	---	75
Micronutrientes	ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,3	1,0
	H ₃ BO ₃	3,1	1,5
	MnSO ₄ .4H ₂ O	11,15	5
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0125	0,0125
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,125	0,125
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0125	0,0125
	KI	0,415	0,375
FeEDTA	FeSO ₄ .7H ₂ O	13,9	13,9
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	18,65	18,65
Vitamina	Glicina	1,0	---
	Ác. nicotínico	0,25	0,5
	Piridoxina-HCl	0,25	0,5
	Tiamina-HCl	0,05	5,0
Supl. orgânicos	Mio-inositol	50	50
	Sacarose	30.000	20.000
pH	-----	5,8	5,8