

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE ENDOFÍTICA
RADICULAR DE *Hyptis marrubioides* Epling, POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO E PERFIL QUÍMICO INDUZIDO
POR ESSA COMUNIDADE EM PLÂNTULAS
MICROPROPAGADAS**

**Autora: Luciana Cristina Vitorino
Orientador: Fabiano Guimarães Silva**

**Rio Verde – GO
Julho – 2011**

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE ENDOFÍTICA
RADICULAR DE *Hyptis marruboides* Epling, POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO E PERFIL QUÍMICO INDUZIDO
POR ESSA COMUNIDADE EM PLÂNTULAS
MICROPROPAGADAS**

**Autora: Luciana Cristina Vitorino
Orientador: Fabiano Guimarães Silva**

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Ciências Agrárias.

**Rio Verde – GO
Julho – 2011**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir mais esta conquista em minha vida;

À minha família, pelo amor e incentivos constantes;

Aos meus alunos, que são a verdadeira razão para a conclusão deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva, do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, pela orientação, confiança e amizade;

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Soares, da Universidade Federal do Mato Grosso, pela co-orientação, compreensão e companheirismo, e também por ter despertado em mim, o interesse pelos microrganismos endofíticos;

À Prof^a Dr^a Ana Helena Januário, da Universidade de Franca, pelo empenho, atenção pacientemente dispensada e pela amizade firmada;

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Souchie, do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, pelas diversas contribuições e pelas discussões enriquecedoras;

Ao Prof. Dr. Alan Carlos Costa, do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, pela gentileza em me ceder equipamentos imprescindíveis na realização de minhas análises;

Aos estudantes do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (IF Goiano – Campus Rio Verde), Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos Endofíticos (UFMT) e Laboratório de Produtos Naturais (UNIFRAN), pela contribuição na realização dos experimentos;

À CAPES, pelo apoio fornecido ao Programa de Pós-Graduação do IF Goiano – Campus Rio Verde;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), por ter me fornecido uma bolsa de mestrado durante o período de realização de meus trabalhos;

A todos os funcionários do IF Goiano – Campus Rio Verde, pela atenção e serviços prestados e a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA DA AUTORA

Luciana Cristina Vitorino, natural de Paineiras – MG, filha de Antônia Inez de Jesus e Adelino Alvez Vitorino, é graduada em Ciências Biológicas pelo Centro de Ensino Superior de Uberaba (CESUB) e possui especialização em Biotecnologia pela Universidade Federal de Lavras (UFLA). Está presente no quadro de professores dos Institutos Federais desde 2007. Atualmente, está vinculada ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS	ii
BIOGRAFIA DO AUTOR	iv
ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO	1
<i>Hyptis marruboides</i> Epling.....	1
Microrganismos endofíticos.....	2
Microrganismos endofíticos como solubilizadores de fosfato de cálcio e fosfato de ferro.....	4
Microrganismos endofíticos como produtores de fitormônios.....	5
Microrganismos e elicitação de respostas metabólicas.....	6
Referências.....	7
OBJETIVOS GERAIS	15
CAPÍTULO I - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ENDOFÍTICOS RADICULARES DE <i>Hyptis marruboides</i> Epling	16
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	16
MATERIAL E MÉTODOS	18

Obtenção do material vegetal.....	18
Isolamento de microrganismos endofíticos.....	19
Obtenção, purificação e manutenção dos endofíticos	20
Caracterização dos isolados bacterianos.....	20
Caracterização dos isolados fúngicos.....	20
Diafanização do material radicular.....	21
Delineamento experimental.....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
RESUMO.....	30
REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO II - SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO E DE FERRO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO <i>IN VITRO</i> POR ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Hyptis marruboides</i> Epling (Lamiaceae).....	39
ABSTRACT.....	39
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
Avaliação da capacidade dos endofíticos em solubilizar CaHPO ₄	41
Avaliação da capacidade dos endofíticos em solubilizar FePO ₄	41
Avaliação da solubilização de CaHPO ₄ e FePO ₄	42
Quantificação da biossíntese de AIA.....	42
- Quantificação da produção de AIA pelos isolados bacterianos.....	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
RESUMO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
CAPÍTULO III - RESPOSTA METABÓLICA INDUZIDA POR FUNGOS E BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM MICROPLANTAS DE <i>Hyptis marruboides</i> Epling.....	57
ABSTRACT.....	57
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
Obtenção, estabelecimento <i>in vitro</i> e manutenção do material vegetal.....	59
Preparo dos inoculantes.....	60

- Crescimento e inoculação dos isolados bacterianos.....	60
- Crescimento e inoculação dos isolados fúngicos.....	60
Condições de cultivo.....	60
Análise da constituição química dos extratos vegetais de plantas <i>ex vitro</i> para obtenção dos padrões.....	61
- Preparação do extrato bruto e Partição líquido-líquido.....	61
- Fracionamento da fração acetato de etila para o isolamento dos padrões.....	61
- Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	61
- Análises quantitativas por CLAE-DAD.....	61
- Preparo das soluções estoque e Construção da Curva dos padrões externos..	62
- Análises por CG/EM.....	62
- Preparo das amostras para a análise por CG/EM.....	62
- Reação de esterificação.....	63
Delineamento experimental.....	63
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
RESUMO.....	76
REFERÊNCIAS.....	77
CONCLUSÃO GERAL.....	84

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo I - Isolamento e caracterização de endofíticos radiculares de *Hyptis marrubioides* Epling

	Página
Tabela 1. Caracterização quanto à coloração de Gram, atividade da enzima catalase, e morfologia dos isolados bacterianos obtidos da raiz de <i>Hyptis marrubioides</i> Epling.....	27
Tabela 2. Caracterização dos nove isolados fúngicos obtidos da raiz de <i>Hyptis marrubioides</i> Epling, quanto à capacidade de desenvolver estruturas reprodutivas em meio BDA e ágar fubá.....	28

Capítulo II - Solubilização de fosfato de cálcio e de ferro e produção de ácido indolacético *in vitro* por isolados endofíticos de *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae)

Tabela 1. Solubilização de CaHPO ₄ , FePO ₄ e produção de Ácido Indolacético (AIA) por microrganismos endofíticos radiculares de <i>Hyptis marrubioides</i> Epling.....	48
---	----

Capítulo III - Resposta metabólica induzida por fungos e bactérias endofíticas em microplantas de *Hyptis marrubioides* Epling

Tabela 1. Tratamentos utilizados no estudo fitoquímico da planta cultivada <i>ex vitro</i> e das microplantas de <i>Hyptis marrubioides</i> Epling após sua exposição aos microrganismos elicitores.....	63
Tabela 2. Sintomas de patogenia provocados por bactérias (ao 10º dia de inoculação) e fungos (ao 5º dia de inoculação) endofíticos utilizados como elicitores em microplantas de <i>Hyptis</i>	

<i>marruboides</i> Epling.....	64
Tabela 3. Quantidades de flavonóide e ácido clorogênico presentes na massa seca das partes aéreas da planta <i>ex vitro</i> de <i>Hyptis marruboides</i> Epling, da microplanta e de microplantas submetidas à inoculação de bactérias e fungos.....	68
Tabela 4. Metabólitos obtidos via CG/EM do extrato de microplantas de <i>Hyptis marruboides</i> Epling submetidas ou não a elicitação por isolados endofíticos bacterianos e fúngicos.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I - Isolamento e caracterização de endofíticos radiculares de *Hyptis marruboides* Epling

	Página
<p>Figura 1. (A) <i>Hyptis marruboides</i> Epling sendo retirada do solo. (B) Duas classes morfolologicamente diferentes de raiz da planta de <i>Hyptis marruboides</i> Epling (B1 – Raiz Grossa; B2 – Raiz Fina). (C) Fragmentos de raiz inoculados em meio BDA para isolamento dos endofíticos.....</p>	18
<p>Figura 2. Extensa colonização por Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) e Dark Septados (DSEs) em raízes de <i>Hyptis marruboides</i> Epling. (A) Hifas endofíticas azuis colonizando intracelularmente o córtex, HI – hifas internas; (B) Co-ocorrência de hifas endofíticas mielinizadas e azuis, DS – hifas de Dark septado; (C) Hifas azuis ocupando o citoplasma celular; (D) Associação micorrízica arbuscular do tipo P – Paris e AP – apressório; (E) V – Vesículas de FMAs; (F) Vesículas de FMAs em destaque; (G) M – Microesclerócios ocupando internamente as células corticais; (H e I) Microesclerócios em destaque. Barras: para A, B, E e G = 50µm; para C, D, F, H e I = 20µm</p>	23
<p>Figura 3. Taxa de colonização de endofíticos nos fragmentos de raízes de <i>Hyptis marruboides</i> Epling e contribuição de fungos e bactérias no total de isolados endofíticos dessas raízes. *Médias comparadas pelo teste Tukey (5%).....</p>	24
<p>Figura 4. Exemplos de morfoespécies de bactérias isoladas de Raiz Grossa (RG) e Raiz Fina (RF) de <i>Hyptis marruboides</i> Epling. Barras: 20µm.....</p>	26
<p>Figura 5. Exemplos de morfoespécies de fungos isoladas da Raiz Grossa e da Raiz Fina de <i>Hyptis marruboides</i> Epling. As fotos de microscopia são correspondentes aos isolados fotografados em placa abaixo. (HV)</p>	

Hifa Vegetativa; (C) Conidióforo; (E) Esclerócio (RG29) <i>Trichoderma sp.</i> ; (RG31) <i>Papulaspora sp.</i> ; (RG32) <i>Fusarium sp.</i> Barras: para A, B e C = 50µm, outros = 20µm.....	30
--	----

Capítulo II - Solubilização de fosfato de cálcio e de ferro e produção de ácido indolacético *in vitro* por isolados endofíticos de *Hyptis marruboides* Epling (Lamiaceae)

Figura 1. (A) Evolução do Índice de Solubilização de fosfato de cálcio em meio GELP, por linhagens endofíticas bacterianas isoladas de <i>Hyptis marruboides</i> Epling, que tiveram IS>1 ao 15º dia de avaliação. (B) Evolução do Índice de Solubilização de fosfato de ferro em meio Reyes por linhagens endofíticas bacterianas, isoladas de <i>H. marruboides</i> Epling, que atingiram IS>6 ao 15º dia de avaliação.....	44
Figura 2. Placas demonstrando variações nos halos de solubilização de CaHPO ₄ , formados por diferentes linhagens bacterianas endofíticas radiculares de <i>Hyptis marruboides</i> Epling. Barra = 1 cm.....	45
Figura 3. Placas demonstrando variações nos halos de solubilização de FePO ₄ , formados por diferentes linhagens bacterianas endofíticas radiculares de <i>Hyptis marruboides</i> Epling. Barras = 1 cm.....	46
Figura 4. Padrões colorimétricos gerados por isolados bacterianos endofíticos de <i>H. marruboides</i> Epling, para quantificação da produção de Ácido Indolacético em meio GYBS enriquecido com triptofano. (C) Controle - meio GYBS na ausência de.....	50

Capítulo III - Resposta metabólica induzida por fungos e bactérias endofíticas em microplantas de *Hyptis marruboides* Epling

Figura 1. Microplantas de <i>Hyptis marruboides</i> Epling utilizadas nos diversos tratamentos, controle e elicitação por bactérias (RF11, RG8, RF10 e RG12) e fungos (RG29, RG31 e RG32) endofíticos obtidos a partir do sistema radicular de uma planta da mesma espécie. Sintomas de murcha e queda foliar (T4 e T5); sintoma de murcha (T9, T10 e T11). Barra: para C1 = 15 cm, outros = 1,5.....	66
Figura 2. Cromatograma obtido por CLAE a 325 nm a partir do extrato de microplantas de <i>Hyptis marruboides</i> Epling submetidas à inoculação do isolado endofítico <i>Fusarium sp.</i> (T11), confirmando a presença do Ácido Clorogênico (Pico 20 min) como pico majoritário.....	69
Figura 3. Espectros no UV obtidos dos picos 12 min (A) e 20 min (B) presentes no extrato de microplantas de <i>Hyptis marruboides</i> Epling submetidas à inoculação dos fungos endofíticos	

<i>Trichoderma</i> sp. (A) e <i>Fusarium</i> sp. (B), representando o padrão de absorção no UV típico de flavonóides e do Ácido Clorogênico, respectivamente.....	69
Figura 4. Estruturas químicas dos compostos (1) quercetina -7- <i>O</i> -glicosídeo, (2) ácido 3,4- <i>O</i> -dicafeoilquínico e (3) andrografolídeo.....	71
Figura 5. Cromatograma obtido via CG/EM do extrato de microplantas de <i>Hyptis marruboides</i> Epling submetidas à inoculação do isolado endofítico RG31 (T10), demonstrando a diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes na amostra.....	73

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E UNIDADES

A	: Apressório
AIA	: Ácido Indolacético
Al-P	: Alumínio-Fósforo
BCG	: Verde de Bomocresol
BDA	: Ágar Dextrose Batata
C	: Conidióforo
Ca-P	: Cálcio-Fósforo
CG/EM	: Cromatógrafo Gasoso Acoplado a Espectrometria de Massas
CLAE-DAD	: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	: Centímetro
DO	: Densidade Óptica
DSEs	: Dark Septados
E	: Esclerócio
Epl	: Epling
eV	: Eletrovolt
FAA	: Formaldeído, Ácido Acético e Álcool Etílico
FAPEG	: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás
Fe-P	: Ferro-Fósforo
FMAs	: Fungos Micorrízicos Arbusculares
g	: Força Centrífuga Relativa
g	: Grama
gPS	: Grama de Peso Seco
GELP	: Glicose, extrato de levedura, peptona, extrato de solo e sais de base
h	: Hora
HI	: Hifas Internas
HIV	: Vírus Imunológico Humano
HV	: Hifa Vegetativa
IFGoiano	: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano
ipdC	: Indol-3-piruvato decarboxilase-EC 4.1.1.74
IS	: Índice de Solubilização
LPS	: Lipopolissacarídeos
M	: Microesclerócio
m	: Metro
mg	: Miligrama

mL	: Mililitros
mM	: Milimolar
MS	: Murashige & Skoog
MSF	: Microrganismos Solubilizadores de Fosfato
MSFI	: Microrganismos Solubilizadores de Fosfato Inorgânico
µg	: Micrograma
µL	: Microlitro
µm	: Micrômetro
µM	: Micromol
nm	: Nanômetro
NS	: Não Solubilizam
NT	: Não Testadas
P	: Paris
PAR	: Radiação Fotossinteticamente Ativa
PCR	: Reação em Cadeia da Polimerase
PGPR	: Rizobactérias Promotoras do Crescimento Vegetal
q.s.p.	: Quantidade Suficiente Para
rpm	: Rotações por Minuto
RF	: Raiz Fina
RFA	: Fungo Associado às Raízes
RG	: Raiz Grossa
SISVAR	: Sistema de Análises Estatísticas e Planejamento de Experimentos
TC	: Taxa de Colonização
UFMT	: Universidade Federal do Mato Grosso
UV	: Ultravioleta
V	: Vesícula
v/v	: Volume por Volume

CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE ENDOFÍTICA RADICULAR DE *Hyptis marruboides* Epling, POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E PERFIL QUÍMICO INDUZIDO POR ESSA COMUNIDADE EM PLÂNTULAS MICROPROPAGADAS

Autora: Luciana Cristina Vitorino

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

RESUMO

A Lamiaceae *Hyptis marruboides* Epling é uma espécie medicinal que ocorre no Cerrado brasileiro. Não existem dados sobre a microbiota endofítica dessa planta, nem sobre a utilização de mecanismos elicitores, no sentido de estimular seu metabolismo. Este trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar linhagens endofíticas do sistema radicular dessa planta. Para isso, fragmentos de raiz grossa e fina foram coletados para diafanização e desinfestação superficial para o isolamento de endofíticos em meio BDA. Ao 10º dia de incubação, foi obtida a Taxa de Colonização (TC) dos fragmentos e bactérias e fungos foram purificados e mantidos em meio de cultura sob refrigeração. As bactérias foram caracterizadas parcialmente por coloração de Gram e teste de catalase. Os fungos foram identificados observando-se e diferenciando-se as estruturas reprodutivas pela técnica de microcultivo com auxílio de um microscópio e chaves de identificação. Observando-se fragmentos de raízes diafanizados, constatou-se a presença de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e fungos endofíticos dark septados (DSEs) nas raízes finas e grossas de *Hyptis marruboides* Epling. A TC de endofíticos foi mais expressiva nos fragmentos de raiz grossa, sendo que nos dois tipos de raízes, o percentual de bactérias foi superior ao de fungos. Bactérias gram positivas e catalase positivas representaram a maioria dos isolados bacterianos, predominando a forma de bacilo. Do total de isolados fúngicos, a maioria apresentou micélio esporulante e foi

constatada a ocorrência dos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Papulaspora*. Os isolados endofíticos de *Hyptis marrubioides* Epl. foram caracterizados com relação à sua capacidade de solubilizar CaHPO_4 , em meio GELP e FePO_4 , em meio de Reyes. Foram caracterizados também, quanto à capacidade de biossintetizar Ácido Indolacético (AIA) em meio GYBS (enriquecido com triptofano). Foram analisadas 42 linhagens bacterianas e seis linhagens fúngicas. Do total de microrganismos testados, 20% formaram halos de solubilização de CaHPO_4 , sendo todos, bactérias. Contudo, essa solubilização foi de nível baixo. Um percentual de 66,6% dos microrganismos testados atingiram alto índice de solubilização de FePO_4 , sendo que entre os fungos, todos solubilizaram esse fosfato. No que se refere à biossíntese de AIA, 50% das bactérias sintetizaram esse composto. Do ponto de vista biotecnológico, destacam-se as linhagens RG9, RG24 e RF18 por apresentarem alto potencial de solubilização de FePO_4 e produção de AIA. Os testes de elicitação avaliaram a resposta metabólica de microplantas de *Hyptis marrubioides* Epling à inoculação de quatro isolados endofíticos bacterianos e três fúngicos, utilizados como elicitores bióticos. Esta resposta foi comparada à de plantas de *Hyptis marrubioides* Epl. crescidas em condições *ex vitro*. No sistema *in vitro*, duas das bactérias endofíticas testadas e os três fungos, se comportaram como patógenos. As bactérias provocaram sintomas de murcha, queda foliar e escurecimento radicular, enquanto os fungos provocaram apenas murcha. Os extratos vegetais das amostras foram avaliados por CLAE-DAD e CG/EM. As análises de CLAE, revelaram duas bandas cromatográficas majoritárias, sendo uma correspondente ao flavonóide quercetina -7-*O*-glicosídeo e outra correspondente a um ácido clorogênico, conhecido como ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico. Foi detectado nas microplantas, baixa concentração do flavonóide, quando comparadas à planta *ex vitro*. O tratamento com o fungo *Fusarium sp.* foi o mais eficiente em estimular a biossíntese de ácido clorogênico. As análises com CG/EM mostraram em geral, uma alta diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos, sendo que alguns metabólitos, tal como 7-Tetradecino e neofitadieno só apareceram nos tratamentos em que houve elicitação. Além disso, o metabólito heptametil-hexadeceno foi biossintetizado, especificamente em tratamento com bactéria em contraste com 4-noneno-1-ol; 14-Heptadecenal, cloreto de 9,12-Octadecadienoila, e 1,1'-Biciclopentil, 2-hexadecil, detectados apenas nos tratamentos com fungos.

CHARACTERIZATION OF THE ROOT ENDOPHYTIC COMMUNITY OF *Hyptis marruboides* Epling, BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL AND CHEMICAL PROFILE INDUCED BY THIS COMMUNITY IN MICROPROPAGATED SEEDLINGS.

Author: Luciana Cristina Vitorino

Adviser: Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

ABSTRACT

The Lamiaceae *Hyptis marruboides* Epling is a medical specie that appears in the Brazilian “Cerrado”. There are not data about the endophytic microbiota of this plant, not even about the use of elicitors mechanisms, to stimulate its metabolism. This work had as aim to isolate and characterize endophytic lineages in the root system of this plant. For this, fragments of thick and thin root were collected for diaphanization and superficial disinfecting to isolate endophytics in a BDA environment. By the tenth day of incubation, it was gotten the Colonization Rate (TC in Portuguese) of the fragments, and bacteria and fungi were partly purified by Gram coloring and catalase test. The fungi were identified by observing and differentiating the reproductive structures using the microculture technique with the help of a microscope and identification keys. Observing the diaphanized root fragments, was found the presence of arbuscular mycorrhizal fungi (FMAs) and endophytic dark septate (DSEs) on the thick and thin roots of *Hyptis marruboides* Epling. The TC (Colonization Rate) of endophytics was more expressive in the fragments of thick root, on which in both kinds of roots, the percentage of bacteria was superior to the percentage of fungi. Gram positive bacteria and catalase represented the most of bacterial isolates, prevailing the bacillus shape. From the amount of fungal isolated, most of them presented spore mycelium and was found the occurrence of the genders *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* and *Papulaspora*. The endophytic isolates of *Hyptis marruboides* Epling were characterized related to their capacity of solubilize CaHPO_4 in a GELP environment and FePO_4 in a Reyes way. They were characterized also, by their capacity of biosynthesize Indoleacetic acid (AIA in Portuguese) in GYBS (enriched with tryptophan) environment. 42 bacterial lineages and six fungal lineages were analyzed. From the amount of tested microorganisms, 20% formed halos of solubilization of CaHPO_4 , being all of them, bacteria. However, this solubilization was of a low level. A

percentage of 66.6% of the tested microorganisms reached a high level of solubilization of FePO_4 , and among the fungi, all of them solubilized their phosphate. Referring to the biosynthesis of AIA, 50% of the bacteria synthesized this compound. From the biotechnological point of view, the lineages RG9, RG24 and RF18 were highlights because they showed high solubilization potential of FePO_4 and production of AIA. The elicitation tests evaluated the metabolic answer of microplants of *Hyptis marrubioides* Epling to the inoculation of four isolated endophytic and three fungal, used as biotic elicitors. This answer was compared to the answer of plants of *Hyptis marrubioides* Epling grown in *ex vitro* conditions. In the *in vitro* system, two of the tested endophytic bacteria and the three fungi, behaved as pathogens. The bacteria provoked symptoms of wilt, foliar fall and darkening, while the fungi provoked only wilt. The vegetal excerpts of the samples were evaluated by CLAE-DAD and CG/EM. The analysis of CLAE showed two major chromatographic bands, one of them corresponding to the flavonoid quercetin -7-*O*-glycoside and another one corresponding to a chlorogenic acid, known as acid 3,4-*O*-dicaffeoylquinic. It was detected in the microplants, a low concentration of the flavonoid, when compared to the plant *ex vitro*. The treatment with the fungus *Fusarium sp.* was the most efficient in stimulates the biosynthesis of chlorogenic acid. The analysis with CG/EM showed, in general, a high diversity of methyl esters of fatty acids, and some of them metabolic, such as 7-Tetradecine and neofitadien just appeared on the treatments where the elicitation happened. Besides, the heptametil-hexadecane was biosynthesized, specifically in treatment with bacterium in contrast with 4-noneno-1-ol; 14-Hepatadecane, chloride of 9,12-Octadecadienoila, and 1,1'-Biciclopentil, 2-hexadecil, detected only in the treatment with fungi.

constatada a ocorrência dos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Papulaspora*. Os isolados endofíticos de *Hyptis marrubioides* Epl. foram caracterizados com relação à sua capacidade de solubilizar CaHPO_4 , em meio GELP e FePO_4 , em meio de Reyes. Foram caracterizados também, quanto à capacidade de biossintetizar Ácido Indolacético (AIA) em meio GYBS (enriquecido com triptofano). Foram analisadas 42 linhagens bacterianas e seis linhagens fúngicas. Do total de microrganismos testados, 20% formaram halos de solubilização de CaHPO_4 , sendo todos, bactérias. Contudo, essa solubilização foi de nível baixo. Um percentual de 66,6% dos microrganismos testados atingiram alto índice de solubilização de FePO_4 , sendo que entre os fungos, todos solubilizaram esse fosfato. No que se refere à biossíntese de AIA, 50% das bactérias sintetizaram esse composto. Do ponto de vista biotecnológico, destacam-se as linhagens RG9, RG24 e RF18 por apresentarem alto potencial de solubilização de FePO_4 e produção de AIA. Os testes de elicitação avaliaram a resposta metabólica de microplantas de *Hyptis marrubioides* Epling à inoculação de quatro isolados endofíticos bacterianos e três fúngicos, utilizados como elicitores bióticos. Esta resposta foi comparada à de plantas de *Hyptis marrubioides* Epl. crescidas em condições *ex vitro*. No sistema *in vitro*, duas das bactérias endofíticas testadas e os três fungos, se comportaram como patógenos. As bactérias provocaram sintomas de murcha, queda foliar e escurecimento radicular, enquanto os fungos provocaram apenas murcha. Os extratos vegetais das amostras foram avaliados por CLAE-DAD e CG/EM. As análises de CLAE, revelaram duas bandas cromatográficas majoritárias, sendo uma correspondente ao flavonóide quercetina -7-*O*-glicosídeo e outra correspondente a um ácido clorogênico, conhecido como ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico. Foi detectado nas microplantas, baixa concentração do flavonóide, quando comparadas à planta *ex vitro*. O tratamento com o fungo *Fusarium sp.* foi o mais eficiente em estimular a biossíntese de ácido clorogênico. As análises com CG/EM mostraram em geral, uma alta diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos, sendo que alguns metabólitos, tal como 7-Tetradecino e neofitadieno só apareceram nos tratamentos em que houve elicitação. Além disso, o metabólito heptametil-hexadeceno foi biossintetizado, especificamente em tratamento com bactéria em contraste com 4-noneno-1-ol; 14-Heptadecenal, cloreto de 9,12-Octadecadienoila, e 1,1'-Biciclopentil, 2-hexadecil, detectados apenas nos tratamentos com fungos.

CHARACTERIZATION OF THE ROOT ENDOPHYTIC COMMUNITY OF *Hyptis marruboides* Epling, BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL AND CHEMICAL PROFILE INDUCED BY THIS COMMUNITY IN MICROPROPAGATED SEEDLINGS.

Author: Luciana Cristina Vitorino

Adviser: Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

ABSTRACT

The Lamiaceae *Hyptis marruboides* Epling is a medical specie that appears in the Brazilian “Cerrado”. There are not data about the endophytic microbiota of this plant, not even about the use of elicitors mechanisms, to stimulate its metabolism. This work had as aim to isolate and characterize endophytic lineages in the root system of this plant. For this, fragments of thick and thin root were collected for diaphanization and superficial disinfecting to isolate endophytics in a BDA environment. By the tenth day of incubation, it was gotten the Colonization Rate (TC in Portuguese) of the fragments, and bacteria and fungi were partly purified by Gram coloring and catalase test. The fungi were identified by observing and differentiating the reproductive structures using the microculture technique with the help of a microscope and identification keys. Observing the diaphanized root fragments, was found the presence of arbuscular mycorrhizal fungi (FMAs) and endophytic dark septate (DSEs) on the thick and thin roots of *Hyptis marruboides* Epling. The TC (Colonization Rate) of endophytics was more expressive in the fragments of thick root, on which in both kinds of roots, the percentage of bacteria was superior to the percentage of fungi. Gram positive bacteria and catalase represented the most of bacterial isolates, prevailing the bacillus shape. From the amount of fungal isolated, most of them presented spore mycelium and was found the occurrence of the genders *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* and *Papulaspora*. The endophytic isolates of *Hyptis marruboides* Epling were characterized related to their capacity of solubilize CaHPO_4 in a GELP environment and FePO_4 in a Reyes way. They were characterized also, by their capacity of biosynthesize Indoleacetic acid (AIA in Portuguese) in GYBS (enriched with tryptophan) environment. 42 bacterial lineages and six fungal lineages were analyzed. From the amount of tested microorganisms, 20% formed halos of solubilization of CaHPO_4 , being all of them, bacteria. However, this solubilization was of a low level. A

percentage of 66.6% of the tested microorganisms reached a high level of solubilization of FePO_4 , and among the fungi, all of them solubilized their phosphate. Referring to the biosynthesis of AIA, 50% of the bacteria synthesized this compound. From the biotechnological point of view, the lineages RG9, RG24 and RF18 were highlights because they showed high solubilization potential of FePO_4 and production of AIA. The elicitation tests evaluated the metabolic answer of microplants of *Hyptis marrubioides* Epling to the inoculation of four isolated endophytic and three fungal, used as biotic elicitors. This answer was compared to the answer of plants of *Hyptis marrubioides* Epling grown in *ex vitro* conditions. In the *in vitro* system, two of the tested endophytic bacteria and the three fungi, behaved as pathogens. The bacteria provoked symptoms of wilt, foliar fall and darkening, while the fungi provoked only wilt. The vegetal excerpts of the samples were evaluated by CLAE-DAD and CG/EM. The analysis of CLAE showed two major chromatographic bands, one of them corresponding to the flavonoid quercetin -7-*O*-glycoside and another one corresponding to a chlorogenic acid, known as acid 3,4-*O*-dicaffeoylquinic. It was detected in the microplants, a low concentration of the flavonoid, when compared to the plant *ex vitro*. The treatment with the fungus *Fusarium sp.* was the most efficient in stimulates the biosynthesis of chlorogenic acid. The analysis with CG/EM showed, in general, a high diversity of methyl esters of fatty acids, and some of them metabolic, such as 7-Tetradecine and neofitadien just appeared on the treatments where the elicitation happened. Besides, the heptametil-hexadecane was biosynthesized, specifically in treatment with bacterium in contrast with 4-noneno-1-ol; 14-Hepatadecane, chloride of 9,12-Octadecadienoila, and 1,1'-Biciclopentil, 2-hexadecil, detected only in the treatment with fungi.

INTRODUÇÃO

***Hyptis marrubioides* Epling**

A família Lamiaceae pertence à ordem Tubiflorae (Lamiales), abrangendo cerca de 200 gêneros e aproximadamente 3.200 espécies distribuídas em todo o mundo (Botrel *et al.*, 2010). Os gêneros *Salvia* (500 espécies), *Hyptis* (350 espécies), *Scutellaria*, *Coleus*, *Plectranthus* e *Satachys* (200 espécies), *Nepeta* (150) e *Teucium* (100) possuem distribuição cosmopolita, embora as plantas destes gêneros sejam encontradas especialmente na região do mediterrâneo (Melendo *et al.*, 2003).

O gênero *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae) é de ampla ocorrência na América Tropical e alta diversidade morfológica, principalmente na região do cerrado brasileiro (Willis & Shaw, 1973; Harley, 1988). Nessa região, a família Lamiaceae é representada pela subtribo Hyptidinae (Tribo Ocimeae) que mostra fortes padrões de variação florística e taxonômica, produzindo um grande número de novas espécies (Almeida & Albuquerque, 2002). Há relatos da ocorrência de espécies extremamente diversas de *Hyptis* no Cerrado brasileiro, muitas apresentando propriedades medicinais e relevância farmacêutica (Arrigoni-Blank *et al.*, 2008; Coutinho *et al.*, 2009).

As plantas desse gênero apresentam um aroma característico, sendo algumas espécies utilizadas no tratamento de infecções gastrointestinais, câimbras, dores e no tratamento de infecções de pele (Falcão & Menezes, 2003). São também importantes fontes de constituintes bioativos com efeito antimicrobiano, citotóxico e inseticida (Kuhnt *et al.*, 1995). Estudos prévios têm comprovado outras atividades biológicas relevantes tais como: atividades antiespasmódica, anti-inflamatória (Di Stasi *et al.*, 1996), antiulcerogênica (Barbosa & Ramos, 1992), larvicida (Costa *et al.*, 2005), antidepressiva (Bueno *et al.*, 2006), dentre outras.

Hyptis marruboides Epling é denominada vulgarmente hortelã-do-campo, sendo considerada uma espécie medicinal do Cerrado (Rodrigues & Carvalho, 2001), sobre a qual é crescente o interesse farmacológico. Os principais constituintes químicos encontrados em *Hyptis marruboides* Epling, ao estudar a variabilidade química presente no óleo volátil desta espécie em duas localidades da região do Cerrado brasileiro, foram cariofila-4(14),8(15)-dien-5 β -ol, eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol, óxido de cariofileno e (β)-cariofileno (Sales *et al.*, 2007).

Microrganismos endofíticos

As plantas no geral são repletas de bactérias e fungos que colonizam suas estruturas tanto externa, quanto internamente. Esses microrganismos fornecem novas vias nutricionais e de defesa, influenciando nas rotas bioquímicas das plantas. Muitos caracteres vegetais são mediados pela microbiota funcional, dessa forma, os microrganismos podem influenciar os ecossistemas através de seus efeitos funcionais sobre a dinâmica populacional de seus hospedeiros. Esses efeitos são atualmente chamados de trações funcionais (Friesen *et al.*, 2011). Portanto, a simbiose entre microrganismos e plantas é um fenômeno natural bem conhecido, e possui um importante papel nas comunidades vegetais, afetando a colonização, competição, coexistência e dinâmica dos nutrientes no solo (Pyrozynski & Hawksworth, 1998; Clay & Holah, 1999; Lemons *et al.*, 2005).

A infestação das plantas, no seu ecossistema natural, sem nenhuma manifestação de doença, pode ocorrer por uma enfermidade de microrganismos. Esses são então conhecidos como endofíticos e ocorrem em grande diversidade no interior de seus hospedeiros (Kogel *et al.*, 2006). Em geral, microrganismos endofíticos penetram os órgãos vegetais por aberturas naturais como estômatos e hidatódios, ou ainda através de feridas. Outras portas de entrada são aberturas causadas por insetos e até mesmo pelas estruturas de fungos patogênicos, como os apressórios. O órgão mais utilizado pelos endófitos para penetração são as raízes. Também pode ocorrer penetração ativa de endofíticos por produção de enzimas ou estruturas que facilitam o processo. Além disso, alguns microrganismos endofíticos são transmitidos verticalmente (Azevedo, 1998), mais especificamente, o grupo que ocorre em gramíneas, conhecido como Claviceptaceous (Márquez *et al.*, 2011).

A associação planta-endofítico é geralmente mutualística. Como benefício da interação o microrganismo recebe nutrição e abrigo da planta hospedeira, aumentando

sua possibilidade de sobrevivência (Muller & Krauss, 2005; Schardl *et al.*, 2004) e garantindo sua disseminação à próxima geração do hospedeiro, através de transmissão vertical ou horizontal (Faeth & Fagan, 2002; Muller & Krauss, 2005). Da mesma forma a planta se beneficia aumentando sua capacidade competitiva frente estresses bióticos (Clay & Schardl, 2002) e abióticos (Schardl *et al.*, 2004; Saikkonen *et al.*, 1998).

A planta melhora seu “fitness” utilizando metabólitos produzidos pelo microrganismo, como enzimas, alcalóides e antibióticos. Também, a síntese de substâncias tóxicas por determinadas plantas contra herbívoros, pode ser estimulada pela presença de enzimas ou outros compostos dos microrganismos endofíticos, que atuando sobre certos genes da planta promovem a biossíntese destes metabólitos secundários tóxicos (Neto *et al.*, 2002).

Para a família Lamiaceae, são raros os trabalhos sobre ocorrência e/ou caracterização da microbiota endofítica. Um ascomiceto endofítico foi isolado de culturas meristemáticas de *Mentha piperita* por Mucciarelli *et al.* (2002). Huang e colaboradores (2008) mensuraram a biodiversidade de fungos endofíticos para 29 plantas utilizadas na medicina tradicional chinesa, dentre estas, a Lamiaceae *Scutellaria indica*, na qual, encontraram maior ocorrência do gênero *Colletotrichum*. Além disso, fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e Dark septados, foram encontrados em Lamiáceas recolonizadoras de uma floresta no norte do estado do Texas (Stevens *et al.*, 2010).

Associações endofíticas no gênero *Hyptis*, foram descritas em poucos trabalhos. Entre estes se destaca o realizado por Barbosa (2005) que isolou 39 microrganismos de diferentes órgãos vegetativos (caule, folha e pecíolo) de *Hyptis suaveolens*, predominando os gêneros bacterianos *Pseudomonas* sp. (23,1%), *Bacillus* sp. (23,0%), *Streptomyces* sp. (20,5%) e *Alcaligenes* sp. (17,9%). Destaca-se também o de Selosse e colaboradores (2009) que tentaram identificar a presença, em *Hyptis verticillata*, de Sabacinales, um táxon saprofítico (Wells, 1994), de associação confirmada em diversas orquídeas (Selosse *et al.*, 2002; Suares *et al.*, 2008). A detecção do fungo foi feita com base na técnica da PCR, utilizando primers específicos para Sabacinales. Contudo, os autores não obtiveram sucesso no isolamento, para a espécie vegetal testada.

Não existem relatos bibliográficos sobre a microbiota endofítica de *Hyptis marrubioides* Epling, nem sobre a relação dessa microbiota com a biossíntese de metabólitos secundários nessa espécie.

Microrganismos endofíticos como solubilizadores de fosfato de cálcio e fosfato de ferro

Alguns microrganismos presentes nos solos possuem papel importante no ciclo natural do fósforo (P), sendo responsáveis pela sua hidrólise para a forma inorgânica, tornando-o disponível às plantas. Estes processos são mediados por enzimas (Rodríguez *et al.*, 2000; Gyaneshwar *et al.*, 2002; Sobral, 2003), ácidos orgânicos (Whitelaw *et al.*, 1999) e sideróforos (Benite & Machado, 2002). As bactérias solubilizadoras de P atuam sobre o fosfato insolúvel por meio de fosfatases, principalmente fosfatases ácidas, com a produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e/ou redução do pH, obtendo-se então o fosfato disponível para as plantas (Nautiyal, 1999; Vasquez *et al.*, 2000; Vassilev & Vassileva, 2003; Sobral, 2003). Com relação aos sideróforos, são consideradas moléculas que sequestram o ferro (Pelzer *et al.*, 2011), liberando o P presente no complexo FePO_4 , estando por isso associados a promoção do crescimento vegetal (Ahmad *et al.*, 2008). Em virtude do potencial desses microrganismos, diversos estudos vêm sendo realizados para avaliar sua capacidade de solubilização de P inorgânico.

Dentre os microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico (MSFI), as bactérias se destacam com o maior potencial de utilização para obtenção de fosfatos solúveis a partir da solubilização biológica de fosfatos e como inoculantes para as culturas. Os principais gêneros bacterianos já relacionados com solubilização de fosfato são: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aereobacter* e *Flavobacterium* (Rodríguez & Fraga, 1999). Estes gêneros também estão relacionados a promoção do crescimento de plantas pela secreção de fitormônios, vitaminas e antibióticos (Reis *et al.*, 2008).

A habilidade das bactérias epifíticas, que colonizam a superfície de órgãos vegetais (Camatti-Sartori *et al.*, 2006) e também das endofíticas, em relação à solubilização do fosfato inorgânico, tem despertado grandes interesses biotecnológicos. As bactérias endofíticas ganham grande importância durante o processo de colonização, porque podem inicialmente colonizar superficialmente o hospedeiro e, conseqüentemente, fornecer P para o desenvolvimento das plantas (Sobral, 2003).

A inoculação de bactérias solubilizadoras de P ou o manejo de sua população em culturas agronomicamente importantes melhora o suprimento de P para as plantas incrementando seu desenvolvimento (Souchie *et al.*, 2005). Bactérias com essa

capacidade podem também atuar como “mycorrhiza helper bacteria”, favorecendo o estabelecimento de fungos micorrízicos (Gull *et al.*, 2004).

A maior parte dos trabalhos envolvendo solubilização de fosfato, quantificam atividade de solubilizadores sobre fosfato de cálcio, contudo, em solos ácidos, tais como os de Cerrado, P se encontra complexado com ferro (Fe) e alumínio (Al) (Büll *et al.*, 1997). Sobre fosfato de ferro (FePO₄), os resultados de solubilização não se apresentam tão satisfatórios quando comparados com outros fosfatos. Por exemplo, a solubilização de hidroxiapatita por *Penicillium rugulosum* foi mais eficiente do que a dos fosfatos de ferro ou alumínio (Reyes *et al.*, 1999). Similarmente, estes fosfatos foram pouco solubilizados quando comparados com hidroxiapatita, CaHPO₄ e Ca₃(PO₄)₂ (Son *et al.*, 2006). No trabalho de Gibson & Mitchell (2004) fungos micorrízicos ericóides solubilizaram CaHPO₄, mas não fosfatos de ferro ou de alumínio. No entanto, mais recentemente, linhagens de *Aspergillus niger*, isoladas de solo, mostraram alta habilidade de solubilizar fosfato de ferro em meio de cultura (Barroso & Nahas, 2005; Barroso & Nahas, 2008).

Microrganismos endofíticos como produtores de fitormônios

Bactérias que habitam as raízes de plantas e exercem efeitos positivos sobre elas são denominadas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR). Os efeitos positivos desses organismos podem ocorrer por influência direta (aumento da solubilização de P, absorção de nutrientes ou produção de reguladores de crescimento vegetal) ou indireta (supressão de patógenos, por produção de sideróforos ou antibióticos) (Asghar *et al.*, 2002).

Entre os mecanismos utilizados por bactérias PGPRs, destaca-se a produção de fitormônios, como auxinas, citocininas e giberelinas (Gray & Smith, 2005). Ácido Indolacético (AIA) é uma auxina comumente produzida por *Aeromonas veronas*, *Agrobacterium* sp., *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Enterobacter* sp., entre outras (Vessey, 2003). De acordo com Arshad & Frankenberger (1991), bactérias endofíticas promovem o crescimento de plantas pela produção de hormônios vegetais ou de substâncias análogas. Assumpção *et al.*, (2009), isolaram 12 ribótipos bacterianos, endofíticos de sementes de soja, por meio da análise de restrição do DNA ribossomal amplificado, e constataram que todos os isolados produziram AIA em meio TSB (10%), suplementado com triptofano. A produção AIA por bactérias pode promover o crescimento da raiz diretamente, pela estimulação da

elongação da célula vegetal ou divisão celular, ou indiretamente, pela influência sobre a atividade da ACC desaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato, um precursor do etileno) (Patten & Glick, 2002).

As bactérias produzem AIA por várias vias de síntese. O Triptofano é considerado um precursor de AIA. Sua adição em meios de cultura promove aumento da síntese, mas há vias de produção independentes de triptofano. Bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* sintetizam AIA por diferentes vias (Kuss, 2007). Em fungos produtores de AIA a via do triptofano também já foi evidenciada. Em culturas do fungo *Aciculosporium tomar* em meio líquido, a produção de AIA pelos isolados atingiu 1 mg L⁻¹ e os resultados mostraram que a via do ácido indol-3-pirúvico (L-triptofano → ácido indol-3-indol pirúvico → indol acetaldeído → IAA) foi a via predominante (Tanaka *et al.*, 2002).

Microrganismos e eliciação de respostas metabólicas

Durante o processo evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos de resposta aos diversos tipos de estresses sejam eles bióticos, como o ataque de patógenos, ou abióticos como os estresses ambientais. As respostas de defesa iniciam com a percepção do estresse, seguido do desencadeamento de uma cascata de eventos moleculares, que é finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas e metabólicas podendo tornar a planta resistente (Margis-Pinheiro *et al.*, 1999).

Diferentes métodos vêm sendo empregados na indução de resistência vegetal, melhorando o “fitness” da planta, controlando patogenias ou mesmo ampliando a síntese de metabólitos bioativos de interesse comercial. Tais métodos consistem na ativação dos mecanismos de defesa latentes presentes na planta hospedeira em resposta ao tratamento com agentes elicitores (Cavalcanti *et al.*, 2006). Com a eliciação, as plantas produzem sinais que serão transportados por toda a planta, e que desencadearão a resistência (Ryals *et al.*, 1996).

A resposta de resistência pode se dar de forma sistêmica ou localizada. Esta última é também chamada resposta de hipersensibilidade, e é expressa através da morte localizada de células (Resende *et al.*, 2003). Quanto à resistência sistêmica, são considerados dois tipos: a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) e a Resistência Sistêmica Induzida (SIR). A SAR é induzida por patógenos ou ativadores químicos, envolvendo o acúmulo de PRPs (Proteínas relacionadas com a patogênese), como mecanismos de defesa da planta. Tal indução é dependente de ácido salicílico e pode

ocasionar o aparecimento de alterações visuais (necroses) na planta que teve seus mecanismos de defesa ativados (Romeiro, 1999). Por outro lado, a SIR é ativada por não patógenos e é dependente de ácido jasmônico e etileno, não envolvendo a síntese de PRPs e não exibindo alterações perceptíveis (Pascholati & Leite, 1995).

Muitos trabalhos têm utilizado microrganismos viáveis (Stangarlin & Pascholati, 1994) ou mesmo inativos como elicitores bióticos. *Saccharomyces cerevisiae* reduziu antracnose e mancha foliar em cultivares de *Sorghum bicolor* (Piccinin *et al.*, 2005). Dong *et al.*, (2003) avaliaram o micélio seco de *Penicillium chrysogenum* inoculado nas raízes de dois cultivares de *Gossypium hirsutum* e dois de *G. barbadence*, obtendo proteção contra a murcha por *Verticillium dahliae*, em todos os cultivares testados. Endofíticos também têm sido caracterizados como indutores de resistência. Vinte e oito rizobactérias induziram resposta a *Pseudomonas syringae* em tomateiro, diminuindo o aparecimento de lesões nos folíolos dessa planta (Silva & Romeiro, 2004).

Especialmente sob condições *in vitro*, o uso de microrganismos tem se mostrado promissor na obtenção de metabólitos de interesse. Filtrados de cultura e cultura desidratada de vários fungos, leveduras e bactérias têm sido aplicados como elicitores. Os fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus oligosporus* e *R. Oryzae*; as leveduras *Rhodotorula glutamis*, *Rhodosporidium toruloides*, *Saccharomyces cereviceae* e *Candida curvata*; e ainda as bactérias *Streptococcus diacetylactis*, *Lactobacillus caseii*, *L. plantarum* e *Pediococcus pentaseaus* foram utilizadas como elicitores em cultura de raízes de *Beta vulgares* L., intensificando a produção de betalaína (Savitha *et al.*, 2006). O uso de extrato de levedura como elicitor, aumentou o conteúdo de alcalóides, sobretudo escopolamina, intracelularmente e no meio de cultura, no cultivo *in vitro* de raízes de *Brugmansia candida* (Pitta-Alvarez, 2000).

De acordo com o nosso conhecimento, para *Hyptis marrubioides* Epling, não existem na literatura trabalhos que relacionem a utilização de elicitores bióticos ou mesmo abióticos, na indução de respostas fisiológicas e metabólicas.

REFERÊNCIAS

1. Almeida, C.F.C.B.R.; Albuquerque, U.P. (2002). Check-list of the Family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 45, 343-353.

2. Ahmad, F.; Ahmad, I.; Khan, M.S. (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.*, 163, 173-181.
3. Arrigoni-Blank, M.F.; Antonioli, A.R.; Caetano, L.C.; Campos, D.A.; Blank, A.F.; Alves, P.B. (2008). Antinociceptive activity of volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. *Phytomedicine*, 15, 334-339.
4. Arshad, M.; Frankenberger, W. T. (1991). Microbiol production of plant hormones. In: Keister, D. L.; Cregan, P. B. (Eds.). The rhizosphere and plant growth. Dordrecht: Kluwer Academic. p.327-334.
5. Asghar, H.N.; Zahir, Z.A.; Srshard, M.; Kharliq. A. (2002). Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biol. Fert. Soils*, 35, 231-237.
6. Assumpção, L.C.; Lacava, P.T.; Dias, A.C.F.; Azevedo, J.L.; Menten, J.O.M. (2009). Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesq. Agropec. Bras.*, 44 (5), 503-510.
7. Azevedo, J.L. (1998). Microrganismos endofíticos. In: Melo IS, Azevedo JL, Ecologia microbiana. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariuna, p.117-137.
8. Barbosa, E.C. (2005). Isolamento de microrganismos endofíticos de *Hyptis suaveolens* (L.) point. (malva-do-campo) e avaliação de seu potencial enzimático e antimicrobiano. UFG – Universidade Federal de Goiás. Goiânia, p.84. (*Dissertação de Mestrado*).
9. Barbosa, P.P.P.; Ramos, C.P. (1992). Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq in rats. *Phytother. Res.*, 6, 114-115.
10. Barroso, C.B.; Nahas, E. (2008). Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. *Pesq. Agropec. Bras.*, 43 (4), 529-535.
11. Barroso, C.B.; Nahas, E. (2005). The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Appl. Soil Ecol.*, 29, 73-83.
12. Benite, A.M.; Machado, S.P. (2002). Sideróforos: “uma resposta dos microrganismos”. *Quim. Nova*, 25 (6B), 1155-1164.
13. Botrel, P.P.; Pinto, J.E.B.P.; Araújo, A.C.C.; Bertolucci, S.K.V. (2010). Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marruboides* Epl. cultivada no campo e em casa de vegetação. *Quim. Nova*, 33 (1), 33-37.

14. Bueno, A.X.; Moreira, A.T.S.; Silva, F.T.; Estevam C.S.; Marchioro, M. (2006). Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 16, 317-323.
15. Büll, L.T.; Lacerda, S.; Nakagawa, J. (1997). Termofosfato: alterações em propriedades químicas em um Latossolo vermelho-escuro e eficiência agrônômica. *Bragantia*, 56 (1), 169-179.
16. Camatti-Sartori, V.; Silva-Ribeiro, R.T.; Vsanhueza, R.M.; Echeverrigaray, S.; Pelizari, D.; Silva, E.M.; Boldo, E.L.; Silva, S.; Graselli, R.; Becker, R.; Pinto, D.; Azevedo, J.L. (2006). Monitoramento de fungos epifíticos nos sistemas de produção orgânico, integrado e convencional da macieira. *Rev. Bras. Agroecol.*, 1 (1), 721-724.
17. Cavalcanti, F.R.; Resende, M.L.V.; Zacaroni, A.B.; Ribeiro Jr., P.M.; Costa, J.C.B.; Souza, R.M. (2006). Acilbenzolar-S-Metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). *Fitopat. Bras.*, 31(4), 372-380.
18. Clay, K.; Holah, J. (1999). Plant diversity in successional fields. *Science.*, 285, 1742-1744.
19. Clay, K.; Schardl, C. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *Amer. Natur.*, 160, S99-S127.
20. Costa, J.G.M.; Rodrigues, F.F.G.; Angélico, E.C.; Silva, M.R.; Mota, M.L.; Santos, N.K.A.; Cardoso, A.L.H.; Lemos, T.L.G. (2005). Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Revi. Bras. Farmacogn.*, 15, 304-309.
21. Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.M.; Lima, E.O.; Siqueira-Junior, J.P. (2009). *In vitro* phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. J. *Photochem. Photobiol. B*, 96, 63-65.
22. Di Stasi, L.C. (Org.). 1996. *Plantas medicinais arte e ciência: Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: UNESP, 230p.
23. Dong, H.; Weijiang, L.; Zhang, D.; Tang, W. (2003). Differential expression of induced resistance by an aqueous extract of killed *Penicillium chrysogenum* against *Verticillium* wilt cotton. *Crop Protec.*, 22, 129-134.
24. Faeth, S.H.; Fagan, W.F. (2002). Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrat. Compara. Biol.*, 42, 360-368.

25. Falcão, D. Q.; Menezes, F. S. (2003). Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. *Rev. Bras. Farm.*, 84, 68-74.
26. Gibson, B.R.; Mitchell, D.T. (2004). Nutritional influences on the solubilization of metal phosphate by ericoid mycorrhizal fungi. *Mycological Res.*, 108, 947-954.
27. Friesen, M.; Porter, S.S.; Stark, S.C.; Wettberg, E.J.V.; Sachs, J.L.; Martinez-Romero, E. (2011). Microbially Mediated Plant Functional Traits. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Systemat.*, 43 (1), 23-46.
28. Gray, E.J.; Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.*, 37, 395-412.
29. Gull, M.; Hafeez, F. Y.; Saleem, M.; Malik, K.A. (2004). Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and mixed rhizobial culture. *Aust. J. Exp. Agri.*, 44, 623-628.
30. Gyaneshwar, P.; Kumar, G.N., Parekh, L.J.; Poodel, P.S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*, 245, 83-93.
31. Harley, R. M. (1988). *Evolution and distribution of Eriope (Labiatae) and its relatives in Brasil*; Vanzolini, P. E.; Heyer, W. R., eds.; Academia Brasileira de Ciências: Rio de Janeiro.
32. Huang, W.Y.; Cai, Y.Z.; Hyde, K.D.; Corke, H.; Sum, M. (2008). Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*, 33, 61-75.
33. Kogel, K.; Franken, P.; Huckelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite – What decides? *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9, 358-368.
34. Kuss, A.V. (2007). Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesq. Agropec. Bras.*, 42, 1459-1465.
35. Kuhnt, M.; Probstle, A.; Rimpler, H.; Bauer, R.; Heinrich, M. (1995). Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. *Planta Medica*, 61 (3), 227-232.
36. Lemons, A.; Clay, K.; Rudgers, J.A. (2005). Connecting plant-microbial interactions above and belowground: a fungal endophyte affects decomposition. *Oecologia*, 145, 595-604.
37. Margis-Pinheiro, M.; Sandroni, M.; Lummerzheim, M.; Oliveira, D. E. (1999). A defesa das plantas contra as doenças. *Ciência Hoje*, 147, 28-32.

38. Márquez, S.S.; Bills, G.F.; Herrero, N.; Zabalgoceazcoa, I. (2011). Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology*. doi:10.1016/j.funeco.2010.12.001.
39. Melendo, M.D.; Cano, E.; Gomez-Mercado, F.; Valle, F. (2003). The endemic flora in the South of the Iberian Peninsula: taxonomic composition, biological spectrum, pollination, reproductive mode and dispersal. *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants*, 198, 260-276.
40. Mucciarelli, M.; Scannerini, S.; Berteà, C.M.; Maffei, M. (2002). An ascomycetous endophyte isolated from *Mentha piperita* L.: biological features and molecular studies. *Mycologia*, 94 (1), 28-39.
41. Muller, C.B.; Krauss, J. (2005). Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8, 450-456.
42. Nautiyal, C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170, 265-270.
43. Neto, P.A.S.P.; Azevedo, J.L.; Araujo, W.L. (2002). Microrganismos endofíticos. *Biotecnol. Cienc. Desenvol.*, 29, 62-76.
44. Pascholati, S.F.; Leite, B. (1994). Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (ed.) Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, v.1, cap. 22, p. 417-454.
45. Patten, C.L.; Glick, B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3795-3801.
46. Pelzer, G.Q.; Helfeld-Vieira, B.A.; Nechet, K.L.; Souza, G.R.; Zilli, J.E.; Perin, L. (2011). Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. *Trop. Plant Pathol.*, 36 (2), 095-103.
47. Piccinin, E.; Di Piero, R.M.; Pascholati, S.F. (2005). Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. *Fitopatol. Bras.*, 30, 05-09.
48. Pitta-Alvares, S.I.; Spollansky, T.C.; Giulietti, A.M. (2000). The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia cândida*. *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 252–258.

49. **Pyrozynski, K. A.**; Hawksworth, D. L. (1998). Introduction and overview. *In: Pyrozynski, K. A.*; Hawksworth, D. L. *Coevolution of Fungi with Plants and Animals*. London: Academic Press., p.1-29.
50. Reis, M. R.; Silva, A. A.; Guimarães, A. A.; Costa, M. D.; Massenssini, A. M.; Ferreira, E. A. (2008). Ação de herbicidas sobre microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico em solo rizosférico de cana-de-açúcar. *Planta Daninha*, 26 (2), 333-341.
51. Resende, M.L.; Salgado, S.M.L.; Chaves, Z.M. (2003). Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatol. Bras.*, 28 (2), 123-130.
52. Reyes, I.; Bernier, L.; Simard, R.R.; Antoun, H. (1999). Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV: induced mutants. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 28, 281-290
53. Rodrigues, V.E.G.; Carvalho, D.A. (2001). Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do Cerrado na região do alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciênc. Agrotec.*, 25 (1), 102-123.
54. Rodríguez, H.; Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.*, 17 (4-5), 319-339.
55. Rodríguez, H.; Gonzalez, T.; Selman, G. (2000). Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbícola* in two rhizobacterial strains. *Journal of Biotechnology*, v.84, p.155-161.
56. Romeiro, R.S. (1999). *Indução de resistência em plantas a patógenos*. Viçosa: Editora UFV, 45p.
57. Ryals, J.A.; Neuenschwander, U.H.; Willits, M.G.; Molina, A.; Steiner, H.Y.; Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 8, 1809-1819.
58. Saikkonen, K.; Faeth, S.H.; Helander, M.; Sullivan, T.J. (1998). Fungal endophytes: a continuum of interaction with host plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 29, 319-343.
59. Sales, J. F.; Pinto, J. E. B. P.; Botrel, P. P.; Oliveira, C. B. A.; Ferri, P. H.; Paula, J. R.; Seraphin, J. C. (2007). Composition and chemical variability in the essential oil of *Hyptis marruboides* Epl. *J. Essential Oils Res.*, 19 (6), 552-556.
60. Savitha, B.C.; Thimmaraju, R. Bhagyalakshmi, N.; Ravishankar, G.A. (2006). Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root

- cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry*, 41, 50–60.
61. Schardl, C.L.; Leuchtmann, A.L.; Spiering, M.J. (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 55, 315-340.
 62. Selosse, M.A.; Dubois, M.P.; Alvarez, N. (2009). Do Sebacinales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycol. Res.*, 113 (10), 1062-1069.
 63. Selosse, M.A.; Weiß, M.; Jany, J.L.; Tillier, A. (2002). Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. And neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology*, 1, 1831–1844.
 64. Silva, H. S. A.; Romeiro, R. S. (2004). Isolamento e seleção massal de rizobactérias indutoras de resistência sistêmica à mancha-bacteriana-pequena do tomateiro. *Rev. Ceres*, 51 (295), 345-354.
 65. Stargarlin, J.R.; Pascholati, S.F. (1994). Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. *Summa Phytopat.*, 20, 16-21.
 66. Stevens, K.J.; Wellner, M.R.; Acevedo, M.F. (2010). Dark septate endophyte and arbuscular mycorrhizal status of vegetation colonizing a bottomland hardwood forest after a 100 year flood. *Aquat. Bot.*, 92, 105-111.
 67. Sobral, J.K. (2003). A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta. 2003. 108p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
 68. Son, H.J.; Park, G.T.; Cha, M.S.; Heo, M.S. (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresour. Technol.*, 97, 204-210.
 69. Souchie, E.L.; Barea, J.M.; Saggin-Junior, O.J.; Da Silva, E.M.R. (2005). Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. *Pesq. Agropec. Bras.*, 40, 1149-1152.
 70. Sua´rez, J.P.; Weiß, M.; Abele, A.; Oberwinkler, F.; Kottke, I. (2008). Members of Sebacinales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycol. Progr.*, 7, 75–85.

71. Tanaka, E.; Tanaka, C.; Ishihara, A.; Kuwahara, Y.; Tsuda, M. (2002). Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Aciculosporium take*, a causal agent of witches' broom of bamboo. *J. Gen. Plant Pathol.*, 69 (1), 1-6.
72. Wells K, 1994. Jelly fungi, then and now! *Mycologia*, 86, 18–48.
73. Whitelaw, M.A.; Harden, T.J.; Helyar, K.R. (1999). Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol. Biochem.*, 31, 655-665.
74. Willis, J.C.; Shaw, H.K.A. (1973). *Dictionary of flowering plants and ferns*. London: Columbia University Press. p.1214.
75. Vasquez, P.; Holguin, G.; Puente, M.E.; Lopez-Cortez,A.; Bashan, Y. (2000). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fert. Soils*, 30, 460-468.
76. Vassilev, N.; Vassileva, M. (2003). Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 61, 435-440.
77. Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586.

OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve por objetivo isolar, caracterizar a comunidade endofítica das raízes de *Hyptis marruboides* Epling e avaliar seu potencial biotecnológico quanto à capacidade de solubilizar fosfato de cálcio e fosfato de ferro, sintetizar ácido indolacético *in vitro* e atuarem como elicitores sobre o metabolismo de microplantas da mesma espécie.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS RADICULARES DE *Hyptis marruboides* Epling

ABSTRACT

Isolating and characterization of root endophytic microorganisms of *Hyptis marruboides* Epling

Endophytic microorganisms colonize asymptotically healthy vegetal tissues, and they can be related to the resistance of the vegetal to the attack of pathogens, or even to the synthesis of secondaries biologically active. This work had as aim to isolate and characterize endophytic lineages of the root system of *Hyptis marrubioide* Epling, a medical Lamiaceae native from the Brazilian “Cerrado”. For this, fragments of thick and thin roots were collected for diaphanization and superficial disinfection to isolate the endophytics in BDA. To the tenth day of incubation, the Colonization Rate (TC in Portuguese) of the fragments was obtained and the endophytics microorganisms were purified and kept in a culture environment under refrigeration. The bacteria were partially characterized by Gram coloration and catalase test. The fungi were identified by observing and differing the reproductive structures by the microculture technique with the help of a microscope and identification keys. When observing the fragments of diaphanized roots, it was found the presence of arbuscular mycorrhizal fungi (FMAs in Portuguese) and dark septate endophytic fungi (DSEs in Portuguese), on the thick and thin roots of *Hyptis marruboides* Epling. The TC (Colonization Rate) of endophytics was more expressive on the fragments of thick root, but in both kinds of roots, the percentage of bacteria was more than fungi. Positive gram bacteria and positive catalase represented the most of the bacterial isolates, and the bacillus shape prevailed. From the amount of fungal isolates, most of them showed spore mycelium, and the occurrence of the genders *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* and *Papulaspora* were detected.

Key words: bacterium, fungus, root system, Lamiaceae.

INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são definidos pela sua capacidade de colonizar tecidos vegetais sem causar sintomas ou alterações morfológicas (Strobel *et al.*, 2004).

O acúmulo de informações sobre a interação planta e microrganismos endofíticos (Teixeira *et al.*, 2007; Lacava *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2009) mostra que estes exercem diferentes e importantes funções ecológicas: atuam na promoção de crescimento vegetal (Ahmad *et al.*, 2008), protegem o hospedeiro contra a herbivoria (Breen, 1994) e/ou produzem metabólitos secundários biologicamente ativos, sendo muitos deles, de importância biotecnológica (Cafêu *et al.*, 2005).

Existem poucos trabalhos de isolamento e caracterização, ou mesmo de variações de populações endofíticas para a família Lamiaceae. Huang e colaboradores (2008) avaliaram a biodiversidade de fungos endofíticos para 29 plantas utilizadas na medicina tradicional chinesa. Dentre estas, uma Lamiaceae (*Scutellaria indica* L.), para a qual encontraram maior ocorrência do fungo filamentososo do gênero *Colletotrichum*.

Associações endofíticas no gênero *Hyptis* foram descritas em raros trabalhos. Destaca-se o realizado por Barbosa (2005) que obteve 39 isolados, de diferentes órgãos vegetativos (caule, folha e pecíolo) de *Hyptis suaveolens* Poit. e detectou predomínio das bactérias *Pseudomonas* sp. (23,1%), *Bacillus* sp. (23,0%), *Streptomyces* sp. (20,5%), *Alcaligenes* sp. (17,9%), *Micrococcus* sp. (5,1%), *Comamonas* sp. (2,6%), *Acinetobacter* sp. (2,6%) e *Staphylococcus* sp. (2,6%), bem como do fungo leveduriforme *Rhodotorula* sp. (2,6%). Destaca-se também o de Selosse *et al.*, (2009) que tentaram identificar a presença de Sabacinales, um táxon saprofítico (Wells, 1994), em *Hyptis verticillata* Jacq. A associação endofítica desse fungo já foi confirmada em diversas orquídeas (Selosse *et al.*, 2002; Sua´rez *et al.*, 2008), sua detecção foi feita com base na técnica da PCR, utilizando primers específicos para Sabacinales. Contudo, os autores não obtiveram sucesso no isolamento, para a espécie vegetal testada.

O gênero *Hyptis* apresenta alta diversidade morfológica, principalmente na região do Cerrado brasileiro, com cerca de 300 a 400 espécies (Harley, 1988). Estas apresentam um aroma característico, sendo que algumas possuem atividade antifúngica (De Oliveira *et al.*, 2004), antibacteriana (Souza *et al.*, 2003), antiulcerogênica (Barbosa & Ramos, 1992), larvicida (Costa *et al.*, 2005) e antidepressiva (Bueno *et al.*, 2006).

A espécie medicinal *Hyptis marrubioides* Epling, que ocorre no Cerrado (Rodrigues & Carvalho, 2001), tem chamado atenção por concentrar em seu óleo essencial terpenóides como a cariofila-4(14),8(15)-dien-5b-ol, a eudesma-4(15),7-dien-1b-ol, o óxido de cariofileno e o (β)-cariofileno (Sales *et al.*, 2007). Os terpenos são empregados na medicina tradicional (Haslam, 1996) por apresentarem propriedades bactericidas (Kang *et al.*, 1992), anti-inflamatórias (Shimizu, 1990) e mesmo

antitumorais (Zheng *et al.*, 1992). São conhecidos também pelas propriedades insetífugas (Jacobson *et al.*, 1990). Por não existirem dados sobre endofitismo em *Hyptis marruboides* Epling, este trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar linhagens endofíticas do seu sistema radicular.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

A planta de *Hyptis marruboides* Epling selecionada para avaliar a presença de microrganismos endofíticos foi um exemplar provindo inicialmente do cultivo *in vitro*, aclimatizado e, posteriormente, adaptado às condições externas da casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IF Goiano – Campus Rio Verde, cujas coordenadas geográficas são: 17° 47' e 53'' de latitude Norte e 51° 55' 53'' de latitude Sul, e altitude de 743 m. A planta foi integralmente retirada do solo com o uso de um escavador manual, cuidadosamente manuseado para impedir danos à raiz e preservando grande quantidade do solo rizosférico (Figura 1A). Esta foi então acondicionada em uma caixa térmica de isopor e conduzida ao Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos Endofíticos da Universidade Federal do Mato Grosso, onde o material foi processado em 24h.

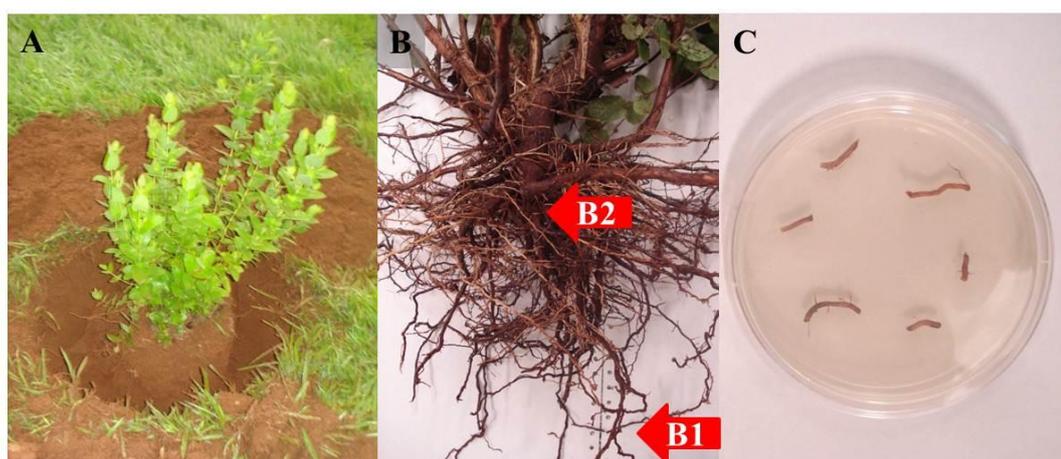


Figura 1. (A) *Hyptis marruboides* Epling sendo retirada do solo. (B) Duas classes morfológicamente diferentes de raiz da planta de *Hyptis marruboides* Epling (B1 – Raiz Grossa; B2 – Raiz Fina). (C) Fragmentos de raiz inoculados em meio BDA para isolamento dos endofíticos.

Isolamento de microrganismos endofíticos

Foi possível distinguir duas classes de raízes morfológicamente distintas do sistema radicular de *Hyptis marrubioides* Epling: a primeira constituída por raízes grossas, de tom escuro e a segunda, raízes finas, de cor clara (Figura 1B). Essas duas classes de raízes foram analisadas separadamente quanto à ocorrência de endofíticos. Fragmentos de raízes de aproximadamente 10 cm de comprimento foram coletados e submetidos ao tratamento prévio de desinfestação, segundo método descrito por Petrini & Muller (1986), com modificações. As amostras foram lavadas meticulosamente em água corrente, para a retirada de todo o solo. Alguns fragmentos de aproximadamente um cm foram fixados e mantidos em FAA - formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico (50%), nas proporções de 5:5:90, segundo Johansen (1940) - para serem posteriormente diafanizados e corados para a observação de estruturas fúngicas. As raízes restantes foram imersas em água de torneira com detergente neutro e agitadas em mesa agitadora a 150 rpm, por 5 minutos. A seguir, foram enxaguadas com água destilada até a retirada completa de todo o detergente. O material foi levado ao fluxo laminar para assepsia com álcool 70% (v/v)/ um min; hipoclorito de sódio (2,5%) de cloro ativo (v/v)/ três min, e novamente álcool 70% (v/v)/ 30 seg. Em seguida, os fragmentos de raízes foram enxaguados três vezes com água destilada estéril e o excesso de umidade retirado com papel filtro esterilizado. Como controle do processo de assepsia, foram coletados 500 µL da água utilizada no enxágue final das amostras, para inoculação em tubos contendo 5 mL de caldo nutriente. Os tubos foram mantidos sob agitação a 150 rpm, *over night*, à temperatura ambiente.

Fragmentos de aproximadamente um cm foram obtidos com auxílio de pinça e tesoura, e seis fragmentos distribuídos superficialmente em placas de Petri contendo meio BDA (Infusão de 200g de batata, dextrose 20g, ágar 15g e água q.s.p. 1000mL) (Figura 1C). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C e observadas diariamente.

Os fragmentos de raiz incubados em meio BDA permaneceram por 10 dias em estufa bacteriológica. A colonização foi avaliada diariamente até o 10º dia para determinação da taxa de colonização (TC) (Petrini *et al.*, 1992), em que:

$$\text{Taxa de Colonização} = \frac{\text{Número de fragmentos com endofítico} \times 100}{\text{Número total de fragmentos avaliados}}$$

Obtenção, purificação e manutenção dos endofíticos

Colônias bacterianas individuais foram purificadas por esgotamento por estria em placas de Petri, contendo meio ágar nutriente e com auxílio de alça de platina. Já as de fungo foram purificadas por obtenção de fragmento de micélio jovem que surgiam das bordas dos fragmentos. Os isolados foram então transferidos para frascos de penicilina contendo meio de cultura ágar nutriente e estocadas na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Biotecnológica e Fitopatologia do IF Goiano – Campus Rio Verde.

Caracterização dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos foram submetidos a testes de caracterização morfológica e bioquímica (atividade da enzima catalase). A coloração de Gram (Humphries, 1974) foi realizada para observação de características da parede celular, forma e arranjo das células. A morfologia das linhagens de bactérias endofíticas foi observada em lâmina, com auxílio de um microscópio óptico. Para a coloração, 15µL de cultura bacteriana, cultivada em caldo nutriente, *over night*, à temperatura ambiente e agitação de 150 rpm, foram fixados por calor em lâmina e em seguida corados. Para verificar a produção da enzima catalase pelas linhagens, 15µL de cultura foram colocados sobre lâmina bacteriológica na presença de 15µL de H₂O₂ (30%). As linhagens catalase-positivas se caracterizaram pela intensa produção de bolhas.

Caracterização dos isolados fúngicos

Os isolados fúngicos foram caracterizados pela técnica de microcultivo em lâmina. Eles foram inicialmente cultivados em meio Ágar Fubá, por sete dias, a 30 °C, de onde blocos de ágar de aproximadamente um cm, contendo filamentos miceliais jovens, foram cortados, com o auxílio de palito de dente esterilizado e transferidos para lâminas, que foram então cobertas com lamínulas e colocadas dentro de câmaras úmidas, constituídas por placa de Petri, preenchida com papel filtro umedecido. Após sete dias de incubação em estufa bacteriológica a 30 °C, as lamínulas foram retiradas e juntadas a outras lâminas que continham uma gota do corante lactofenol. As estruturas foram observadas em Fotomicroscópio Leica DM500, com câmera Leica ICC 50, adaptada a um software LAZ EZ, versão 1.8.0, e comparadas por meio de literatura especializada (Barron, 1968; Sutton, 1973; Sutton, 1980; Carmichael *et al.*, 1980; Alexopoulos *et al.*, 1996).

Diafanização do material radicular

Para verificar a existência de estruturas fúngicas no interior das raízes de *Hyptis marrubioides* Epling, amostras previamente fixadas em FAA foram diafanizadas utilizando-se o método de Koskey & Gemma (1989), modificado. Para isso, essas raízes foram imersas em KOH (2%), autoclavadas a 121 °C, por 20 min e transferidas para uma nova solução de KOH (2%), por 24 h, à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma solução alcalina de peróxido de hidrogênio amoniacal (0,5%) e H₂O₂ (0,5%) em água, por 60 min. Finalmente, as raízes foram coradas com azul de tripano 0,05% em lactoglicerol (1:1:1-ácido láctico, glicerol, água) (Phillips & Heyman, 1970). Lâminas para microscopia foram montadas com fragmentos e observados com auxílio de microscópio. As estruturas fúngicas foram classificadas de acordo com Petrini (1986) e Peterson *et al.*, (2004).

Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo os tratamentos, dois tipos de raízes: grossas e finas. Foram inoculadas sete placas por tratamento. Cada placa, contendo seis fragmentos de raiz, foi considerada uma unidade amostral. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias relativas à taxa de colonização comparadas pelo teste Tukey (5%), com o auxílio do software estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise microscópica das raízes de *Hyptis marrubioides* Epling revelou a presença de estruturas fúngicas no interior deste órgão nas duas classes de raízes estudadas. Não se observou alterações morfológicas nem sintomas de doenças nas raízes coletadas para este trabalho. As estruturas observadas permitiram identificar um grupo de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e outro grupo endofítico conhecido como *dark septate* (DSEs) (Figura 2). Estes grupos também foram encontrados em todas as plantas da família Lamiaceae analisadas por Weishampel & Bedford (2006) ao trabalharem com espécies de quatro pântanos na cidade de Nova York. Eles estudaram as associações em raízes de *Lycopus americanus* Muhl. ex W. Bart., *Lycopus uniflorus* Michx., *Mentha x piperita* L. e *Prunella vulgaris* L., além de outras plantas de diferentes famílias. A espécie *Teucrium canadense* L. foi avaliada por Stevens *et al.*,

(2010) quando analisavam a presença de FMAs e DSEs na vegetação recolonizadora de uma floresta texana. Nessa Lamiaceae, foi visualizada a presença desses dois grupos fúngicos, ocorrendo em frequência mediana.

Neste trabalho, os FMAs tiveram sua presença caracterizada por estruturas como hifas intensamente coradas em azul, arbúsculos e vesículas (Figura 2 E e F). Algumas dessas vesículas ocuparam quase a totalidade do volume celular, e outras um pouco menos desenvolvidas. Foi observada a ocorrência de associação micorrízica arbuscular do tipo Paris, caracterizada por intenso enovelamento das hifas no córtex radicular (Figura 2 D). Associações do tipo Arum não foram visualizadas nos fragmentos corados. Smith & Smith (1997) sugeriram uma preferência por associações Paris em plantas do Cerrado, em condições naturais. Contudo, trabalhos com FMAs em Lamiaceae, tal como o desenvolvido por Zubek & Blaszkowski (2009), identificaram prevalência de associação do tipo Arum. Eles analisaram 31 espécies medicinais e encontraram FMAs em 30 delas, sendo 23 do tipo Arum. Dessas espécies analisadas, sete eram Lamiáceas, das quais apenas uma apresentou associação do tipo Paris. O benefício da associação com FMAs tem sido demonstrado pela eficiência de algumas espécies em incrementar o desenvolvimento vegetativo e nutricional de plantas (Nunes *et al.*, 2010).

As condições edáficas e climáticas de Cerrado *stricto sensu* limitam o crescimento e estabelecimento das espécies vegetais. A demanda evaporativa da atmosfera resulta em controle de transpiração e diminuição de taxas fotossintéticas em espécies do Cerrado por *feedback* (Franco & Lüttge, 2002). Herbáceas, como *H. marrubioides*, não apresentam sistemas radiculares profundos a ponto de atingirem os lençóis freáticos. Conseqüentemente, estas espécies vegetais necessitam superar o estresse hídrico imposto pelos primeiros 2 m de profundidade de solo. A formação de micorrizas proporciona maior volume de solo explorado (Siqueira, 2002), podendo ser decisivo no estabelecimento e crescimento dessas herbáceas por aumentar a disponibilidade de nutrientes e água, fundamentais na geração e transporte de fotoassimilados (Martins *et al.*, 1999).

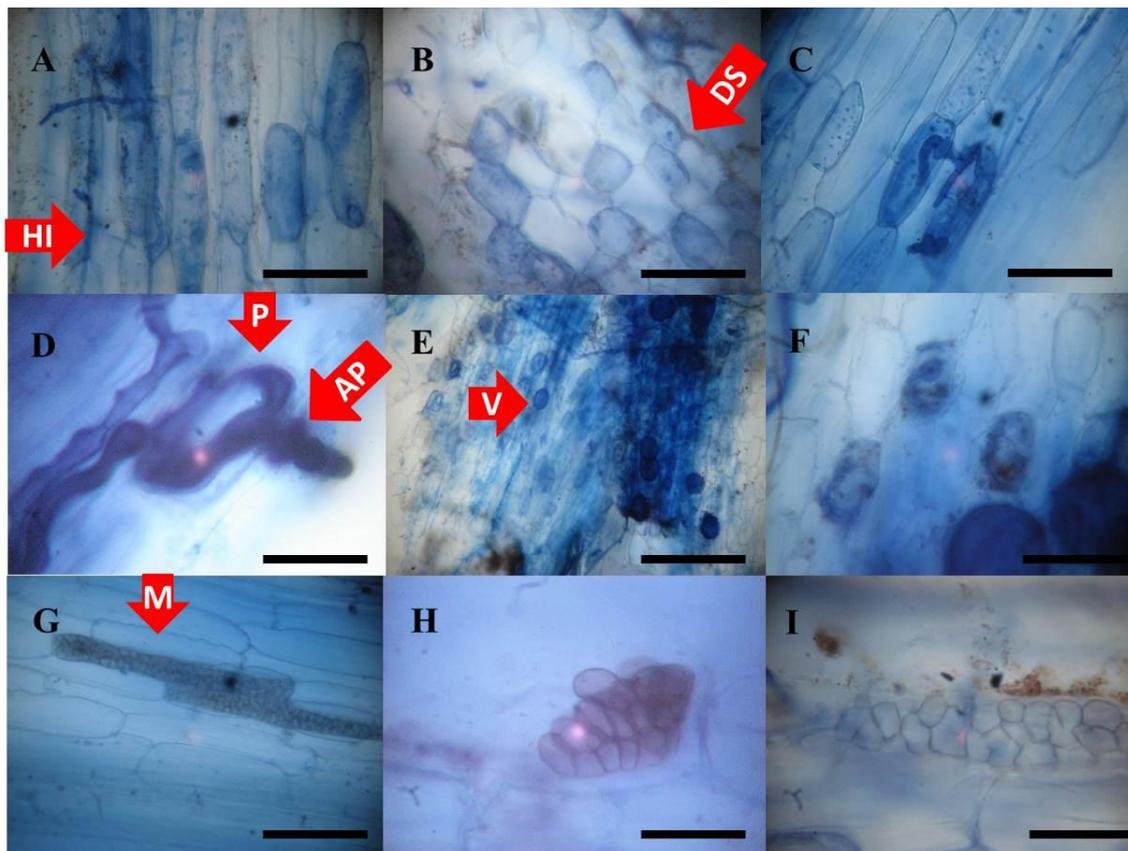


Figura 2. Extensa colonização por Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) e Dark Septados (DSEs) em raízes de *Hyptis marruboides* Epling. (A) Hifas endofíticas azuis colonizando intracelularmente o córtex, HI – hifas internas; (B) Coocorrência de hifas endofíticas mielinizadas e azuis, DS – hifas de Dark septado; (C) Hifas azuis ocupando o citoplasma celular; (D) Associação micorrízica arbuscular do tipo P – Paris e AP – apressório; (E) V – Vesículas de FMAs; (F) Vesículas de FMAs em destaque; (G) M – Microesclerócios ocupando internamente as células corticais; (H e I) Microesclerócios em destaque. Barras: para A, B, E e G = 50µm; para C, D, F, H e I = 20µm.

A presença de DSEs foi confirmada pela identificação intraradicular de hifas mielinizadas e microsclerócios (Figura 2 B, G, H e I). Microesclerócios foram detectados no interior do córtex radicular, alguns ocupando todo o volume das células corticais. Outras pequenas estruturas de microsclerócios coexistiram com hifas septadas escuras, sugerindo que eles correspondam a diferentes fases de desenvolvimento de DSEs ou diferentes espécies DSE. Em algumas plantas, os DSEs são mais frequentes que os FMAs (Wilbeorce *et al.*, 2002). Ao analisar a raiz de sete Lamiáceas medicinais Zubek & Blaszkowski (2009) encontraram colonização por esses fungos em todas as plantas analisadas, com frequência de colonização de 66,9% em *Lavandula angustifolia* Mill.

A ausência de turvação nos tubos com caldo nutriente, em que foi inoculada a água de enxágue, evidenciou eficiência no processo de assepsia superficial das amostras, indicando que os microrganismos que cresceram no meio de isolamento tinham, de fato, origem endofítica.

A análise de variância para a taxa de colonização mostrou diferença entre os dois tipos de raízes analisados, contudo, não foi mostrada significância entre as repetições destes tratamentos. Isso demonstra que a colonização evoluiu da mesma maneira em todas as placas consideradas. Entretanto, foi mais expressiva nos fragmentos de raiz grossa, ou seja, foram analisados 42 fragmentos para cada tipo de raiz, dos quais 95,2% dos fragmentos de raiz grossa e 35,6% dos de raiz fina resultaram em colonização (Figura 3). Essa diferença pode estar relacionada à idade do tecido, ou seja, pode ser que as raízes grossas sejam raízes mais velhas e por isso tenham demonstrado maior taxa de colonização. Essa relação é comprovada em estudos como os de Espinosa-Garcia & Langenheim (1990), sendo consistente com a hipótese de transmissão predominantemente horizontal, de endofíticos em plantas. Tecidos vegetais mais velhos teriam tido mais tempo para acumular endofíticos do meio, em oposição aos tecidos com colonização inicial (Taylor *et al.*, 1999). No trabalho de Guo *et al.*, (2008), a colonização de acículas e da casca de *Pinus tabulaeformis* Carr. por fungos endofíticos, foi maior em tecidos de mais idade.

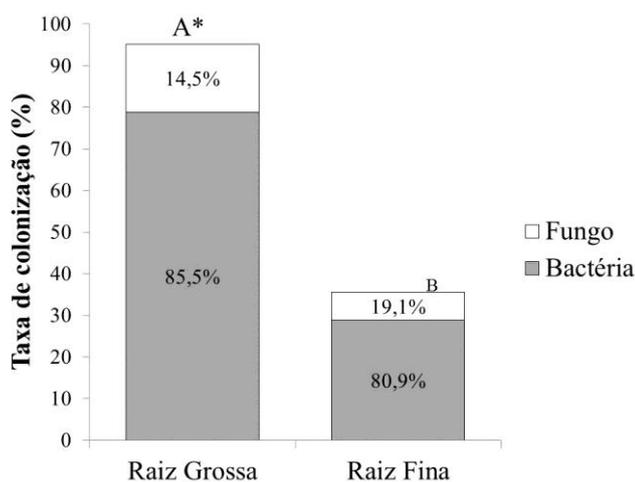


Figura 3. Taxa de colonização de endofíticos nos fragmentos de raízes de *Hyptis marrubioides* Epling e contribuição de fungos e bactérias no total de isolados endofíticos dessas raízes. *Médias comparadas pelo teste Tukey (5%).

Nos dois tipos de raízes analisadas, a contribuição de bactérias para o total de colonização foi superior à dos fungos (Figura 3). Esses resultados foram atingidos, mesmo usando-se como meio de cultivo o BDA, que é um meio seletivo para fungos. É possível que a não adição de antibacterianos a esse meio tenha influenciado no aparecimento de grande número de bactérias, com relação ao pequeno número de fungos. Monesso *et al.*, (2008), trabalhando com *Viguiera robusta* Gardn, uma espécie endêmica do Cerrado, inibiram o crescimento de bactérias endofíticas foliares, em BDA, utilizando terramicina (50mg mL^{-1}). Por outro lado, Pimentel *et al.*, (2010) descartaram a utilização de antibiótico em BDA, ao isolarem endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda* L. e ainda assim, conseguiram obter 17 gêneros de fungos.

Variações significativas nas populações de endofíticos autóctones ou mesmo introduzidas têm sido relatadas (Souza *et al.*, 2004; Roesch *et al.*, 2007). Estas variações são atribuídas ao tipo de planta hospedeira, idade da planta, tipo de tecido, período de amostragem e ambiente (Zinniel, 2002). Pimentel *et al.*, (2006) encontraram maior quantidade de endofíticos em folhas adultas, do que em folhas jovens de erva-mate. Nesse trabalho, foram encontrados 42 isolados de bactérias endofíticas, das quais 27 foram de fragmentos de raiz grossa e 15 de raiz fina (Figura 4). A diversidade de bactérias endofíticas também foi estudada por Assumpção *et al.*, (2009) que obtiveram 176 isolados de sementes de soja, sendo que 18% dos isolados controlaram o crescimento de fungos fitopatogênicos, 100% produziram AIA e 39% solubilizaram fosfato. No trabalho de Aravind *et al.*, (2009), 74 bactérias endofíticas foram isoladas da raiz e do caule de *Piper nigrum* L., sendo estas pertencentes a seis gêneros: *Pseudomonas* (20 cepas), *Serratia* (1 cepa), *Bacillus* (22), *Arthrobacter* (15), *Micrococcus* (7), *Curtobacterium* (1), além de oito isolados não identificados. Três isolados foram considerados eficazes para a supressão de *Phytophthora capsici*, agente causal da podridão da raiz.

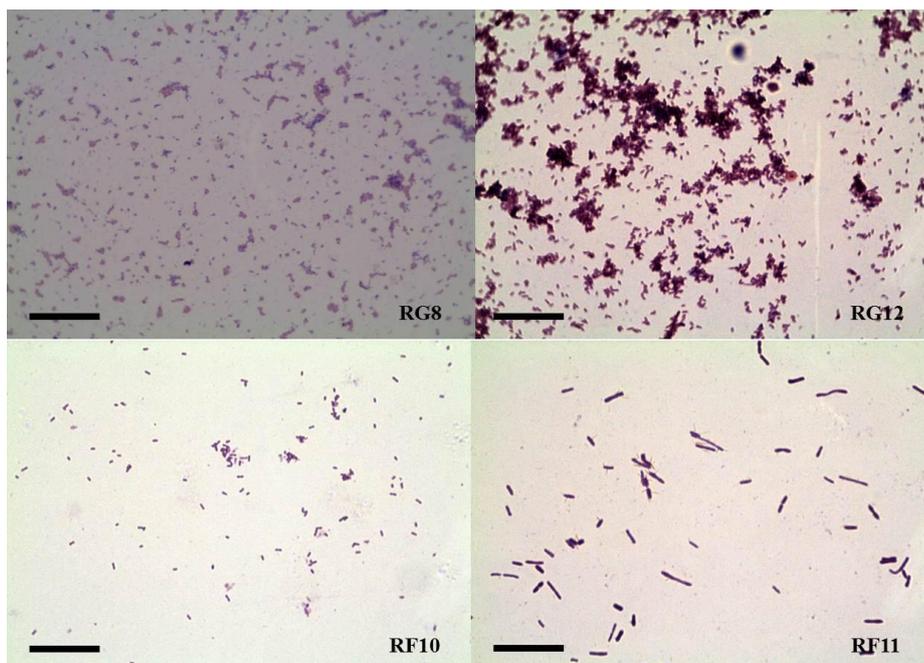


Figura 4. Exemplos de morfoespécies de bactérias isoladas de Raiz Grossa (RG) e Raiz Fina (RF) de *Hyptis marrubioides* Epling. Barras: 20µm.

Do total de bactérias endofíticas isoladas, as Gram positivas foram maioria (69%), correspondendo a 63% dos isolados de raiz grossa e 80% dos isolados de raiz fina. Com relação à produção da enzima catalase, 55% dos isolados demonstraram-se capazes de biossintetizá-la; 51,8% dos isolados de raiz grossa e 60% dos de raiz fina. Bactérias com forma de bacilo predominaram (57%) no total de isolados, representando 44,4% em raiz grossa e 73,3% em raiz fina (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização quanto à coloração de Gram, atividade da enzima catalase, e morfologia dos isolados bacterianos obtidos da raiz de *Hyptis marrubioides* Epling.

Tipo de Raiz		Tabela		(%)
Raiz Grossa	Gram	+	63,0	
		-	37,0	
	Catalase	+	51,8	
		-	48,2	
	Forma	Coco	22,2	
		Bacilo	44,4	
Raiz Fina		Coco-bacilo	33,4	
	Gram	+	80,0	
		-	20,0	
	Catalase	+	60,0	
		-	40,0	
	Forma	Coco	13,3	
	Bacilo	73,3		
	Coco-bacilo	13,4		

Foram isolados também nove linhagens de fungos endofíticos, das quais, sete diferenciaram estruturas reprodutivas e dois foram considerados micélio estéril (Tabela 2). A taxa de colonização foi maior nos fragmentos de raiz grossa, onde foram encontrados seis isolados fúngicos e menor nas raízes finas, em que foram contabilizados três isolados. Esses números são baixos quando comparados com outros trabalhos de isolamento de endofíticos. Huang *et al.*, (2009) encontraram 27 taxons tipos morfolologicamente distintos de fungos utilizando três espécies de *Artemisia* (*Artemisia capillaris*, *A. indica*, and *A. lactiflora*) e isolando-os a partir das folhas e também do caule. A diversidade de fungos endofíticos também foi estudada em *Taxus chinensis*, de onde isolou-se 115 fungos utilizando segmentos da casca. Estes foram agrupados em 23 gêneros, sendo que *Diaporthe*, *Phomopsis*, *Acremonium* e *Pezizula*

foram os gêneros dominantes, para os quais, 13 espécies representativas foram capazes de produzir taxol (Liu *et al.*, 2009).

Dentre os isolados fúngicos de raiz grossa (Tabela 2 e Figura 5), um foi classificado como pertencente ao gênero *Penicillium* (Ascomycota, Eurotiomycetes, Eurotiales), um gênero muito comum como endofítico, amplamente investigado quanto à produção de substâncias bioativas. Um endofítico desse gênero, isolado de plantas de mangue foi caracterizado por Shao *et al.*, (2010) como produtor da penicicolina, um alcaloide citotóxico. Endofíticos do gênero *Penicillium* tem demonstrado capacidade de produzir enzimas de interesse industrial, tal como queratinases (El-Gendy, 2010). Esse tipo fúngico tem sido encontrado associado a várias espécies vegetais, como: *Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae) (Marinho *et al.*, 2007); *Melia azedarach* L., do qual se isolou compostos metabólicos bioativos, tais como os meroterpenos, preaustinóide, austinolida e brasiliamida (Fill *et al.*, 2009); *Vellozia compacta* Mart. ex. Schult., presente no Cerrado do estado de Tocantins (Rodrigues, 2010) e também no café (*Coffea arabica* L.), de onde foram isoladas 13 espécies de *Penicillium* (Vega *et al.*, 2006).

Tabela 2. Caracterização dos nove isolados fúngicos obtidos da raiz de *Hyptis marrubioides* Epling, quanto à capacidade de desenvolver estruturas reprodutivas em meio BDA e ágar fubá.

	Código do isolado	Fungo	Esporula em meio BDA ¹	Esporula em ágar fubá ²
Raiz Grossa	RG16	-	+	+
	RG27	<i>Penicillium sp.</i>	+	+
	RG29	<i>Trichoderma sp.</i>	+	+
	RG30	-	+	+
	RG31	<i>Papulaspora sp.</i>	+	+
	RG32	<i>Fusarium sp.</i>	+	+
Raiz Fina	RF12	-	-	-
	RF14	-	-	-
	RF20	-	+	+

¹Ágar Dextrose Batata; ²Fubá (40g), tween 80 (10mL) e ágar (15g).

Fusarium (Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales) é outro gênero identificado nos isolados de raiz grossa, sendo comumente relatado como endofítico. *Fusarium* foi isolado de duas *Annonas*, correspondendo à maior parcela de endofíticos, sendo também relacionado à promoção de crescimento nessas plantas (Silva, 2006). Uma referência especial a esse gênero é feita por Maciá-Vicente *et al.*, (2008), que ao analisarem as populações endofíticas associadas à raiz de plantas nativas do mediterrâneo, encontraram *Fusarium* e *Phoma* como dominantes. Além disso, preferência hospedeira foi encontrada por três espécies de *Fusarium* estudadas. *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* foram especialmente isoladas de plantas da família Leguminosae, enquanto *Fusarium equiseti* mostraram preferência por *Lygeum spartum* L. (Gramineae). No trabalho de Herrera (2010), *Fusarium* foi considerado um importante Fungo Associado às Raízes (RFA), por apresentar ampla distribuição e relação estreita com gramíneas da América do Norte.

Neste trabalho, o gênero *Trichoderma* (Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales) foi isolado também dos fragmentos de raiz grossa. Associações endofíticas com esse fungo já foram relatadas em diversos trabalhos incluindo o de Bailey *et al.*, (2009), que isolaram quatro cepas desse fungo em *Theobroma cacao* L., onde observou-se, inclusive, a utilização de tricomas como porta de entrada desse fungo, para o tronco do cacaueteiro. A ampla colonização de espécies vegetais por *Trichoderma* tem sido explicada pelo fato deste fungo possuir atividade biocontroladora de fitopatógenos (Ownley *et al.*, 2010) e também por induzir resistência sistêmica, o que foi comprovadamente avaliado por Perazzoli *et al.*, (2011) em videiras, onde *Trichoderma* reduziu a severidade do míldio, através da ativação e maior expressão de genes relacionados à defesa.

Entre os isolados de raiz grossa, foi encontrado também, o gênero *Papulaspora* (Ascomycota). Esse gênero tem chamado atenção pela capacidade antimicrobiana dos extratos de suas culturas. No trabalho de Ramos *et al.*, (2010), uma fração acetato de etila, proveniente do endofítico *Papulaspora immersa*, isolado das raízes de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp) H. Rob., apresentou concentração inibitória mínima de $90\mu\text{g mL}^{-1}$, frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Por outro lado, extratos de *Papulaspora* endofítico, demonstraram no trabalho de Gallo *et al.*, (2010), atividade citotóxica, além de terem sido fonte para a obtenção de 14 metabólitos secundários, sendo três deles, descritos pela primeira vez. Esse gênero já foi também relatado, como endofítico radicular de orquídeas, correspondendo a 2% dos isolados (Gezgin & Eltem, 2009).

Esse trabalho isolou os endofíticos radiculares de *Hyptis marrubioides* Epling, e espera-se de trabalhos futuros o isolamento a partir de outros órgãos dessa planta, no sentido de avaliar a ocorrência sistêmica das linhagens encontradas nesse trabalho. Pretende-se também, a partir dos dados aqui obtidos, a caracterização dos isolados bacterianos, utilizando-se outros parâmetros metabólicos e também sua identificação.

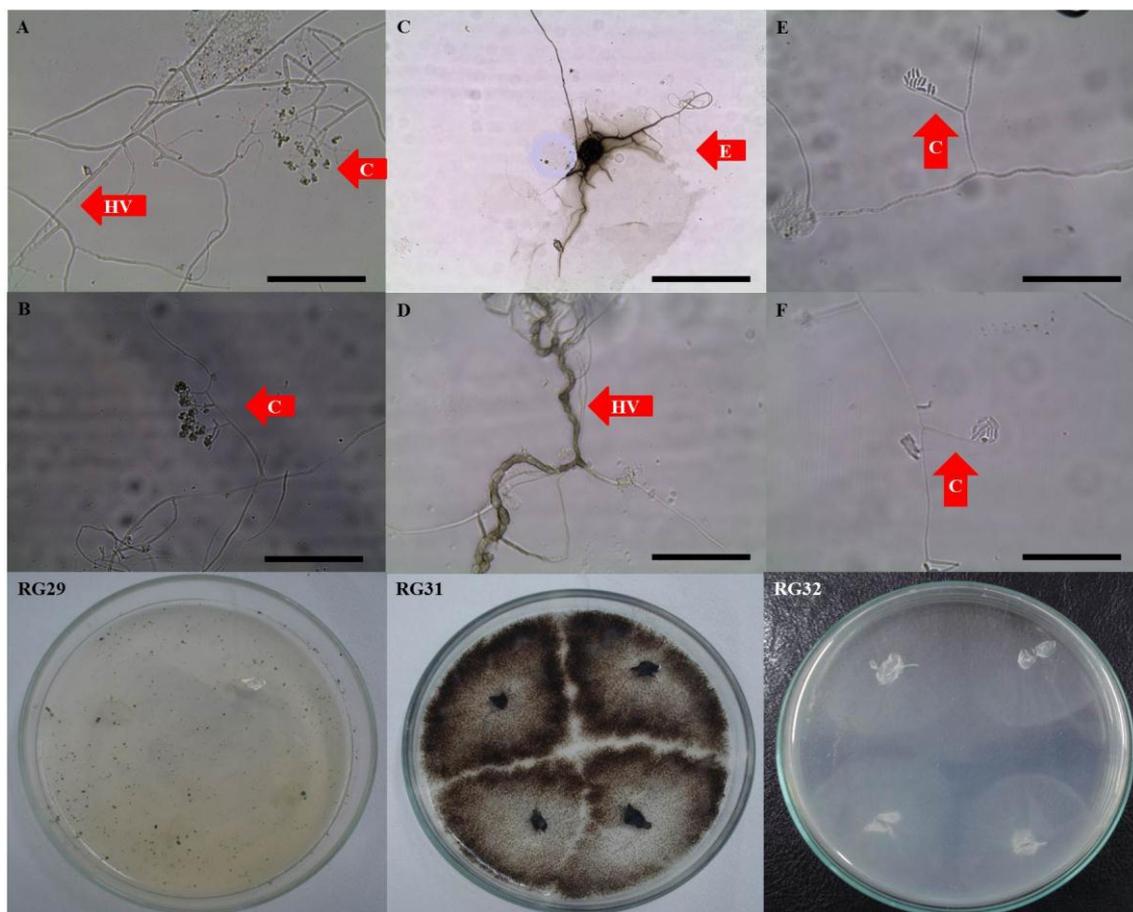


Figura 5. Exemplos de morfoespécies de fungos isoladas da Raiz Grossa e da Raiz Fina de *Hyptis marrubioides* Epling. As fotos de microscopia são correspondentes aos isolados fotografados em placa abaixo. (HV) Hifa Vegetativa; (C) Conidióforo; (E) Esclerócio (RG29) *Trichoderma sp.*; (RG31) *Papulaspora sp.*; (RG32) *Fusarium sp.* Barras: para A, B e C = 50µm, outros = 20µm.

RESUMO

Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos radiculares de *Hyptis marrubioides* Epling

Microrganismos endofíticos colonizam assintomaticamente tecidos vegetais saudáveis, podendo estar relacionados à resistência do vegetal ao ataque de patógenos, ou mesmo à síntese de metabólitos secundários biologicamente ativos. Este trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar linhagens endofíticas do sistema radicular de *Hyptis marrubioides* Epling, uma Lamiaceae medicinal, nativa do Cerrado. Para isso, fragmentos de raiz grossa e raiz fina foram coletados para diafanização e desinfestação superficial para o isolamento de endofíticos em BDA. Ao 10º dia de incubação, foi obtida a Taxa de Colonização (TC) dos fragmentos e os microrganismos endofíticos foram purificados e mantidos em meio de cultura sob refrigeração. As bactérias foram caracterizadas parcialmente por coloração de Gram e teste de catalase. Os fungos foram identificados observando-se e diferenciando-se as estruturas reprodutivas pela técnica de microcultivo com auxílio de um microscópio e chaves de identificação. Observando-se fragmentos de raízes diafanizados constatou-se a presença de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e fungos endofíticos dark septados (DSEs) nas raízes finas e grossas de *Hyptis marrubioides* Epling. A TC de endofíticos foi mais expressiva nos fragmentos de raiz grossa, sendo que nos dois tipos de raízes, o percentual de bactérias foi superior ao de fungos. Bactérias gram positivas e catalase positivas representaram a maioria dos isolados bacterianos, predominando a forma de bacilo. Do total de isolados fúngicos, a maioria apresentou micélio esporulante, e foi constatada a ocorrência dos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Papulaspora*.

Palavras-chave: bactéria, fungo, sistema radicular, Lamiaceae.

REFERÊNCIAS

1. Ahmad, F.; Ahmad, I.; Khan, M.S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.*, 163, 173-181.
2. Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*, IV edition. John Wiley & Sons, New York: 1-868.
3. Aravind, R.; Kumar, A.; Eapen, S.J.; Ramana, K.V. (2009). Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48 (1), 58-64.

4. Assumpção, L.C.; Lacava, P.T.; Cavalcante, A.; Dias, F.; Azevedo, J.L.; Menten, J.O.M. (2009). Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesq. Agropec. Bras.*, 44 (5), 503-510.
5. Azevedo, J. L., (1998). Microrganismos Endofíticos, *In: Melo, J.L. Ecologia Microbiana*, 1 ed. Jaguariúna, cap. 4, p.117-137.
6. Bailey, B.A.; Stream, M.D.; Wood, D. (2009). Trichoderma species from endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. *Mycol. Res.*, 113 (12), 1365-1376.
7. Barbosa, E.C. (2005). Isolamento de microrganismos endofíticos de *Hyptis suaveolens* (L.) poit. (malva-do-campo) e avaliação de seu potencial enzimático e antimicrobiano. UFG – Universidade Federal de Goiás. Goiânia, p.84. (*Dissertação de Mestrado*).
8. Barbosa, P. P. P.; Ramos, C. P. (1992). Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq in rats. *Phytother. Res.*, 6 (2), 114-115.
9. Barron, G.L. (1968). *The Genera of Hyphomycetes from Soil*. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland: 1-364.
10. Breen, J. P. (1994). *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 39, 401–423.
11. Bueno, A. X.; Moreira, A. T. S.; Silva, F. T.; Estevam C. S.; Marchioro, M. (2006). Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 16, 317-323.
12. Cafêu, M.C.; Silva, G.H.; Teles, H.L.; Bolzan, V.S.; Araújo, A.R. (2005). Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Quim. Nova*, 28 (6), 991-995.
13. Carmichael, J.W.; Kendrick, B.; Connors, I.L.; Sigler, L. (1980). *Genera of Hyphomycetes*. University of Alberta Press, Edmonton: 1-386.
14. Costa, J. G. M.; Rodrigues, F. F. G.; Angélico, E. C.; Silva, M. R.; Mota, M. L.; Santos, N. K. A.; Cardoso, A. L. H.; Lemos, T. L. G. (2005). Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 15 (4), 304-309.
15. De Oliveira, C. M. A.; Silva, M. D. R.; Kato, L.; Da Silva, C. C.; Ferreira, H. D.; Souza, L. K. H. (2004). Chemical composition and antifungal activity of the

- essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, 15, 756-759.
16. Dias, A.C.F.; Costa, F.E.C.; Andreote, F.D.; Lacava, P.T.; Teixeira, M.A.; Assumpção, L.C.; Araújo, W.L.; Azevedo, J.L.; Melo, I.S. (2009). Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 189-195.
 17. El-Gendy, M.M.A. (2010). Keratinase Production by Endophytic *Penicillium* spp. Morsy1 Under Solid-State Fermentation Using Rice Straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162 (3), 780-794.
 18. Espinosa-Garcia, F.J.; Langenheim, J.H. (1990). The leaf fungal endophytic community of a coastal redwood population diversity and spatial patterns. *New Phytol.*, 116, 89-97.
 19. Ferreira, D.F. (2003). *Sisvar*: versão 4.2. Lavras: UFLA.
 20. Fill, T.P.; Santos, R.M.G.; Barrison, A.; Rodrigues-Filho, E.; Souza, A.Q.L. (2009). Atividade antibiótica de substâncias produzidas pelo fungo *Penicillium* sp., um endofítico de *Melia azedarach*. *Z. Naturforsch.*, 64, 355.
 21. Franco, A.C.; Lüttgeu. (2002). Midday depression in savanna trees: Coordinated adjustments in photochemical, efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water use efficiency. *Oecologia.*, 131, 356-365.
 22. Fuentes-Ramirez, L.E.; Jimenes-Salgado, T.; Abarca-Ocampo I.R.; Caballero-Mellado J. (1993). *Acetobacter diazotrophicus* na indolacetic acid producing bactéria from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil*, 154, 145-150.
 23. Gallo, M.B.C.; Cavalcanti, B.C.; Barros, F.W.A.; Moraes, M.O.; Costa-Lotufo, L.V.; Pessoa, C.; Bastos, J.K.; Pupo, M.T. (2010). Chemical Constituents of *Papulaspora immersa*, an Endophyte from *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae), and Their Cytotoxic Activity. *Chem. Biodiver.*, 7, 2941-2950.
 24. Gezgin, Y.; Eltem, R. (2009). Diversity of endophytic fungi from various Aegean and Mediterranean orchids (saleps). *Turk J. Bot.*, 33, 439-445.
 25. Guo, L-D.; Huang, G-R.; Wang, Y. (2008). Seasonal and Tissue Age Influences on Endophytic Fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. *J. Integr. Plant Biol.*, 50 (8), 997-1003.
 26. Harley, R.M. (1988). Evolution and distribution of *Eriope* (Labiatae) and its relatives in Brazil. *In: Proceedings of a workshop on Neotropical distribution*

- patterns (P.E. Vanzolini & W.R. Heyer, eds.). Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p.71-120.
27. Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod.*, 59, 205-215.
 28. Herrera, J. (2010). Shifting fungal endophyte communities colonize *Bouteloua gracilis*: effect of host tissue and geographical distribution. *Mycologia*, 102 (5), 1012-1026.
 29. Huang, W.Y.; Cai, Y.Z.; Hyde, K.D.; Corke, H.; Sum, M. (2008). Biodeiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*, 33, 61-75.
 30. Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Surveswaran, S., Hyde, K.D., Corke, H. and Sun, M. (2009). Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diversity*, 36, 69-88.
 31. Humphries, J. (1974). *Bacteriology*. London: J. Murray, p.92.
 32. Jacobson, M. (1990). *Glossary of Plant-Derived Insect Deterrents*, CRC Press: Boca Raton.
 33. Johansen, D. A. (1940). *Plant Microtechnique*. New York: Mc Graw Hill Book Co.
 34. Jumpponen, A.; J. M. Trappe. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytol.*, 140, 295–310.
 35. Kang, R.; Helms, R.; Stout, M.J.; Jaber, H.; Nakatsu, T. (1992). Vietnamese culinary herbs in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2328-2332.
 36. Koskey, R.E.; Gemma, J.N. (1989). A modified procedure for staining roots to detect VA mucorrhizas. *Mycol. Res.*, 92, 486-505.
 37. Lacava, P.T.; Silva-Stenico, M.E.; Araújo, W.L.; Simionato, A.V.C.; Carrilho, E.; Tsai, S.M.; Azevedo, J.L. (2008). Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. *Pesq. Agropec. Bras.*, 43, 521-528.
 38. Liu, K.; Ding, X.; Deng, B.; Chen, W. (2009). Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36 (9), 1171-1177.
 39. Maciá-Vicente, J.G.; Jansson, H.; Abdullah, S.K.; Descals, E.; Salinas, J.; Lopez-Llorca, L.V. (2008). Fungal root endophytes from natural vegetation in

- mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 64 (1), 90-105.
40. Marinho, A.M.R.; Marinho, P.S.B.; Rodrigues Filho, E. (2007). Constituintes químicos de *Penicillium* sp. um endofítico de *Murraya paniculata* (Rutaceae). *Ver. Ciênc. Exatas Nat.*, 9 (2), 189-200.
 41. Martins, C.R.; Miranda, J.C.C.; Miranda, L.N. (1999). Contribuição de fungos micorrízicos arbusculares nativos no estabelecimento de *Aristida setifolia* Kunth em áreas degradadas do Cerrado. *Pesq. Agropec. Bras.*, 34, 665-674.
 42. Monesso, L.S.; Kawano, C.Y.; Ribeiro, P.H.; Nomizo, A.; Goldman, G.H.; Pupo, M.T. (2008). Chaetoglobosinas produzidas por *Chaetomium globosum*, fungo endofítico associado a *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae). *Quim. Nova*, 31 (7), 1680-1685.
 43. Nunes, J.L.S.; Souza, P.V.D.; Marodin, G.A.B.; Fachinello, J.C. (2010). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and indolebutyric acid interaction on vegetative growth of 'Aldrighi' peach rootstock seedlings. *Ciênc. Agrotec.*, 34 (1), 80-86.
 44. Ownley, B.H.; Gwinn, K.D.; Veeega, F.E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*, 55 (1), 113-128.
 45. Perazzolli, M.; Roatti, B.; Bozza, E.; Pertot, I. (2011). *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Biological Control*, 58, 74-82.
 46. Peterson, R.L.; Massicotte, H.B.; Melville, L.H. (2004). *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. National Research Council Canada, p.173.
 47. Petrini, O.; Muller, E. (1986). Haupt und nebenfruchtformen europaischer pilze. *Mycologia Helv.*, 1, 501-627.
 48. Petrini, O.; Stone, J.; Carroll, F.E. (1992). Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Can. J. Bot.*, 60, 789-796.
 49. Petrini, O. (1986). Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. *In*: Fokkema, N. J.; Heuvel, L. van den (Ed.). *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge: University Press, p.87-175.
 50. Phillips, J.M.; Hayman, D.S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicularárbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55, 158-160.

51. Pimentel, I.C.; Kuczkowski, F.R.; Chime, M.A.; Auer, C.G.; Grigoletti Junior, A. (2006). Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. st.-hil.). *Floresta*, 36 (1), 123-128.
52. Pimentel, I.C.; Figura, G.; Auer, C.G. (2010). Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*. *Summa Phytopathol.*, 36 (1), 85-88.
53. Ramos, H.P.; Braun, G.H.; Pupo, M.T.; Said, S. (2010). Antimicrobial activity from endophytic fungi *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immerse*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53 (3), 629-632.
54. Rodrigues, R.L. (2010). Fungos endofíticos associados a *Vellozia compacta* Mart. Ex Schult. F. (Velloziaceae). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, p.70. (Dissertação de mestrado).
55. Rodrigues, V.E.G.; Carvalho, D.A. (2001). Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciênc. Agrotec.*, 25 (1), 102-123.
56. Roesch, L.F.W.; Passaglia, L.M.P.; Bento, F.M.; Triplett, E.W.; Camargo, F.A.O. (2007). Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, 31 (6), 1367-1380.
57. Sales, J. F.; Pinto, J. E. B. P.; Botrel, P. P.; Oliveira, C. B. A.; Ferri, P. H.; Paula, J. R.; Seraphin, J. C. (2007). Composition and chemical variability in the essential oil of *Hyptis marruboides* Epl. *J. Essential Oils Res.*, 19 (6), 552-556.
58. Shao, C.; Wang, C.; Gu, Y.; Wei, M.; Pan, J.; Deng, D.; She, Z.; Lin, Y. (2010). Penicinoline, a new pyrrolyl 4-quinolinone alkaloid with an unprecedented ring system from an endophytic fungus *Penicillium* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20 (11), 3284-3286.
59. Selosse, M.A.; Dubois, M.P.; Alvarez, N. (2009). Do Sebaciales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycol. Res.*, 113 (10), 1062-1069.
60. Selosse, M.A.; Weiß, M.; Jany, J.L.; Tillier, A. (2002). Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. And neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology*, 11, 1831–1844.
61. Shimizu, M. (1990). Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants. *Chem. Pharm. Bull.*; 38, 2283-2287.
62. Silva, R.L.O.; Luz, J.S.; Silveira, E.B.; Cavalcante, U.M.T. (2006). Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção

- do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Bot. Bras.*, 20 (3), 649-655.
63. Siqueira, J.O.; Lambais, M.R.; Stumer, S.L. (2002). Fungos micorrízicos arbusculares. *Biot. Ci. Desenv.*, 25, 12-2.
 64. Smith, F.A.; Smith, S.E. (1997). Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol.*, 137, 373-388.
 65. Souza, L.K.H.; Oliveira, C.M.A.; Ferri, P.H.; Oliveira, J.G.; Souza, A.H.; Fernandes, O.D.L.; Silva, M.D.R. (2003). Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. *Mem. I Oswaldo Cruz.*, 98, 963-965.
 66. Stevens, K.J.; Wellner, M.R.; Acevedo, M.F. (2010). Dark septate endophyte and arbuscular mycorrhizal status of vegetation colonizing a bottomland hardwood forest after a 100 year flood. *Aquat. Bot.*, 92, 105–111.
 67. Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.*, 67 (2), 257-268.
 68. Sua´rez, J.P.; Weiß, M.; Abele, A.; Oberwinkler, F.; Kottke, I. (2008). Members of Sebaciales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycol. Progr.*, 7, 75–85.
 69. Sutton, B.C. (1980). *Coelomycetes - Fungi Imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
 70. Sutton, B.C. (1973). Coelomycetes. In: The fungi: An advanced treatise. Vol. IVA. A taxonomic review with keys: ascomycetes and fungi imperfecti (eds. G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow and A.S. Sussman). Academic Press, New York: 513-582.
 71. Teixeira, M.A.; Melo, I.S. de; Vieira, R.F.; Costa, F.E. de C.; Harakava, R. (2007). Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovariedades em três estados brasileiros. *Pesq. Agropec. Bras.*, 42, 43-49.
 72. Taylor, J.E.; Hyde, K.D.; Jones, E.B.G. (1999). Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytol.*, 142, 335–346.
 73. Wieishampel, P.A.; Bedford, B. (2006). Wetland dicots and monocots differ in colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes. *Mycorrhiza*, 16, 495–502.
 74. Wells, K. (1994). Jelly fungi, then and now! *Mycologia*, 86, 18–48.

75. Wilberforce, E. M., G. W. Griffith, L. Boddy, and R. Griffiths. (2002). The widespread occurrence of dark septate endophyte fungi in grassland communities, abstr. P. 319. Abstr. *7th Int. Mycol. Cong.*, Oslo, Norway.
76. Vega, F.E. (2006). *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. *Mycologia*, 98 (1), 31-42.
77. Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586.
78. Zheng, G.Q.; Kenney, P.M.; Lam, L.K.T. (1992). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines. *Nat. Prod.*, 55, 999-1003.
79. Zinniel, D.K.; Lambrecht, P.; Harris, N.B.; Feng, Z.; Kuczmarski, D.; Higley, P.; Ishimaru, C.A.; Arunakumari, A.; Barletta, R.G.; Vidaven, A.K. (2002). Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2198–2208.
80. Zubek, S.; Blaszkowski, J. (2009). Medicinal plants as hosts of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes. *Phytochem. Rev.*, 8, 571–580.

SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO E DE FERRO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO *IN VITRO* POR ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae)

ABSTRACT

Solubilization of calcium and iron phosphate and production of indoleacetic acid *in vitro* by endophytic isolates of *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae)

Vegetal growth and development are associated to the plant access to minerals and phytohormones. Some microorganisms solubilizes phosphate, and producing phytohormones, with functional traces of promoters of vegetal growth. Endophytic isolates of the root of *Hyptis marrubioides* Epling, a Lamiaceae, were characterized related to their capacity of solubilize phosphate of Ca, in a GELP environment and phosphate of Fe, in basal environment of Reyes *et al.*, (1999), modified by Gadagi & Sa (2002). They were characterized according to their capacity to biosynthesize Indoleacetic Acid (AIA) in a GYBS environment, enriched with tryptophan. In the tests of solubilization, 42 bacterial and six fungal lineages were analyzed. From the amount, 20% formed halos of solubilization of CaHPO₄, although this solubilization has been of a low level. None of the fungi tested solubilized CaHPO₄. A percentage of 59% of microorganisms reached high levels of solubilization of FePO₄, and all of the fungi showed their capacity. On the biosynthesis test of AIA, only the bacterial isolates were tested, and 52% of them synthesized this compound, drafting the RF18, RG9, RF13 and RG24 lineages that showed expressive dosages of the phytohormones on the tested conditions, respectively: 95.13; 16.21 and 11.96ug mL⁻¹. From the biotechnological point of view, the lineages RG9, RG24 and RF18 drafted, because they present high potential of solubilization of FePO₄ and AIA production.

Key words: solubilization halos, phosphate solubilizer microorganisms, indoleacetic acid, vegetal growth promoters.

INTRODUÇÃO

O crescimento e o desenvolvimento vegetal encontram-se diretamente ligados ao acesso da planta a minerais essenciais como fósforo (Santos *et al.*, 2010), bem como à

biossíntese de fitormônios, como os da classe das auxinas (Multani *et al.*, 2003; Renhardt *et al.*, 2003; Kieffer *et al.*, 2010). O papel funcional de microrganismos endofíticos, associados ao sistema radicular de plantas, tem explicado incrementos na produtividade (Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006; Silva *et al.*, 2009) por promoção do crescimento vegetal (Payne *et al.*, 2006; Mehnaz, 2011).

O P é o segundo elemento que mais limita a produtividade das plantas, sendo muito requerido, pois está presente em componentes estruturais das células como nos ácidos nucleicos e fosfolipídios das biomembranas, e também em componentes metabólicos móveis armazenadores de energia, como o ATP (Almeida *et al.*, 2009). A deficiência de P limita a produção agrícola principalmente em solos ácidos, tais como os de Cerrado (Nakayama *et al.*, 1998). Neste bioma, o P solúvel em água transforma-se em fosfato de Fe e fosfato de Al (Silva *et al.*, 2011), ou seja, complexos moderadamente solúveis (Yadav *et al.*, 2010). Alguns microrganismos do solo solubilizam essas formas inorgânicas não disponíveis de P (Son *et al.*, 2006; Chai *et al.*, 2011). Trabalhos recentes têm atestado essa capacidade, para microrganismos endofíticos. Em associações micorrízicas arbusculares, as plantas adquirem fosfato por meio de uma extensa rede de hifas extra-radiciais do fungo, que ultrapassam as zonas de depleção da raiz em direção às regiões do solo onde este mineral se encontra (Harrison *et al.*, 1995).

Os estudos de solubilização de fosfato, normalmente avaliam a capacidade da microbiota edáfica e endofítica em solubilizar o complexo Ca-P, sendo que os resultados refletem somente a realidade de solos alcalinos (Gadagi & Sa, 2002). Alguns microrganismos têm demonstrado capacidade de solubilizar também Fe-P e/ou Al-P, representando melhor a análise de interesse, no contexto de solos tropicais (Chagas Jr *et al.*, 2010).

Há diversos relatos sobre a capacidade de endofíticos biossintetizarem fitormônios (Gray & Smith, 2005). O ácido indolacético (AIA) é conhecido por desencadear tanto respostas rápidas (aumento da alongação celular) como lentas (divisão e diferenciação celular) (Dobbelaere *et al.*, 2003). Este hormônio vegetal é comumente produzido por bactérias promotoras de crescimento como *Aeromonas veronae*, *Agrobacterium* sp., *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Enterobacter* sp., entre outras (Vessey, 2003). El-Khawas & Adachi (1999) demonstraram que as espécies *Azospirillum brasilense* (ATCC 2970) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) têm potencial para a produção de AIA em condições laboratoriais. Além disso, verificaram

que a quantidade deste hormônio vegetal produzido pode ser ajustada *in vitro*, característica estratégica para a promoção do crescimento vegetal.

Diversas espécies do gênero *Hyptis* (Lamiaceae) ocorrem no Cerrado brasileiro e apresentam caracteres bem distintos. Muitas possuem propriedades medicinais e relevância farmacêutica (Arrigoni-Blank *et al.*, 2008; Coutinho *et al.*, 2009). A espécie *Hyptis marrubioides* Epling é uma medicinal nativa dessa região (Rodrigues & Carvalho, 2001). Pela ausência de dados sobre o potencial biotecnológico da microbiota endofítica de *Hyptis marrubioides* Epling, esse trabalho visa identificar traços funcionais (Friezer *et al.*, 2011) nos isolados endofíticos dessa espécie, ou seja, verificar a capacidade desses de solubilizar fosfato de Ca e de Fe em meio de cultura sólido e de sintetizar AIA *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliação da capacidade dos endofíticos em solubilizar CaHPO₄

Isolados bacterianos obtidos a partir das raízes de *Hyptis marrubioides* Epling e estocados na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Biotecnológica e Fitopatologia do IF Goiano – Campus Rio Verde, foram pinçados dos frascos de armazenamento (frascos de penicilina) e crescidos em caldo nutriente (extrato de carne 3g, peptona 5g e H₂O q.s.p. 1000mL) *over night*, sob agitação, a 30°C. O volume de 5µL de cada uma das culturas foi depositado sobre placas de Petri contendo meio GELP, descrito por Sylvester-Bradley *et al.*, (1982), modificado (sem a adição de extrato de solo). O fosfato de cálcio foi obtido pela adição de 1 mL de uma solução de K₂HPO₄ (5%) e 1 mL de uma solução de CaCl₂ (10%) por 10 mL de meio. Para os isolados fúngicos, foram utilizados discos de micélio de aproximadamente 0,5cm de diâmetro, ativados em BDA por sete dias, à temperatura ambiente. Estes discos foram distribuídos em placas de Petri com meio GELP (um disco por placa). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C, durante 15 dias.

Avaliação da capacidade dos endofíticos em solubilizar FePO₄

Para a realização deste teste, os isolados bacterianos e fúngicos foram crescidos conforme metodologia descrita no item anterior. Transferiu-se os inóculos das culturas bacterianas e discos das culturas fúngicas (um disco por placa) para placas contendo o meio basal de Reyes *et al.*, (1999), modificado por Gadagi & Sa (2002). Como indicador de pH do meio, foi utilizado o corante verde de bromocresol (BCG), para o

qual foi preparada uma solução estoque na concentração de 0,5%, em álcool 70%, com pH ajustado para 6,5, utilizando KOH (1N). Uma alíquota de 5 mL dessa solução estoque foi adicionada a 1000 mL do meio Reyes. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C, durante 15 dias.

Avaliação da solubilização de CaHPO₄ e FePO₄

A avaliação da solubilização de fosfato de Ca e de Fe nos meios sólidos ocorreu até o 15º dia de incubação. O diâmetro dos halos ao redor das colônias foi mensurado a cada 5 dias e ao final de 15 dias, calculou-se o Índice de Solubilização (IS) (Berraqueiro *et al.*, 1976).

$$\text{IS} = \frac{\text{Diâmetro do Halo}}{\text{Diâmetro da colônia}}$$

Para as linhagens fúngicas testadas, o IS foi calculado ao 5º dia de incubação, antes que as colônias tomassem toda a área da placa. O potencial de solubilização das linhagens foi classificado de acordo com Silva Filho & Vidor (2000): baixa solubilização (IS < 2), média solubilização (2 < IS < 3) e alta solubilização (IS > 3).

Os testes foram realizados com 48 linhagens endofíticas previamente isoladas das raízes de *Hyptis marruboides* Epling, sendo 42 linhagens bacterianas e seis fúngicas. A capacidade de solubilização foi analisada em quadruplicata para cada linhagem e para cada fosfato testado. Os dados relativos à evolução dos halos de solubilização foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott (5%), utilizando-se o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

Quantificação da biossíntese de AIA

Este teste foi realizado exclusivamente com os 42 isolados bacterianos de *Hyptis marruboides* Epling. A produção de AIA foi avaliada por meio do método colorimétrico descrito por Gordon & Weber (1951). Inicialmente, as bactérias foram crescidas em 10 mL de meio de cultura DYGS (Rodriguez Neto *et al.*, 1986) por 24 h, a 30 °C, sob agitação constante (160 rpm). Foram assepticamente coletados 3 mL dessas culturas para se determinar a densidade óptica (DO) a 600nm. Todas as amostras tiveram sua DO corrigida, através de diluição com solução salina (0,85%). Posteriormente, 50µL de cada uma das suspensões com DO 0,1, foram inoculados em meio DYGS suplementado com 100 µg mL⁻¹ de triptofano (Da Silveira, 2008). As

culturas permaneceram incubadas sob agitação constante (160 rpm), a 30 °C por 72h, quando procedeu-se a quantificação da produção de AIA.

- Quantificação da produção de AIA pelos isolados bacterianos

As amostras crescidas em meio DYGS enriquecido com triptofano, após 72h, foram centrifugadas por 10 min, a 10.000 \times g e temperatura de 10 °C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de ensaio, sendo adicionados 2 mL do reagente de Salkowski (1 mL de FeCl₃ – 1,35g/10mL; 50 mL de HClO₄ – 35%). Os tubos foram mantidos no escuro por 30 min (Hartmann *et al.*, 1983). A presença do hormônio foi visualizada pela coloração rósea e quantificada pela leitura em espectrofotômetro (530 nm). Todas as dosagens foram realizadas em triplicata. Como controle negativo, utilizou-se apenas o meio de cultura DYGS com triptofano. A concentração de AIA foi determinada utilizando a equação da curva padrão de AIA e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) formaram em torno de si um halo facilmente visível por contraste com o meio opaco, conforme descrito por Kang *et al.*, (2002). Entre os microrganismos testados para solubilização de fosfato de Ca, pouco mais de 20% das linhagens apresentaram capacidade solubilizadora (Tabela 1), sendo que para todas as linhagens em que se constatou formação de halo em meio GELP, a solubilização foi caracterizada como baixa (IS<2) (Figura 2). Esses resultados estão abaixo dos obtidos por Pedrinho *et al.*, (2010) que observaram, após os 15 dias de cultivo, em todos os seus 27 isolados, halos com diâmetro variando entre 12 e 55 mm. No trabalho de Assumpção *et al.*, (2009) foi avaliada a solubilização de Ca₃(PO₄)₂ por 62 isolados bacterianos endofíticos de sementes de soja, dos quais, 39% demonstrou atividade solubilizadora, com halos variando entre 0,2 e 8,3 cm.

A evolução do crescimento dos halos formados pelas linhagens bacterianas em meio GELP foi avaliada a cada cinco dias, e analisada para as linhagens que tiveram IS>1, a qual apresentou comportamento quadrático (Figura 1A). IS>1 foi tomado como referência em função de que todos os índices de solubilização obtidos nesse teste foram baixos, sendo mais expressivos, aqueles entre 1 e 2.

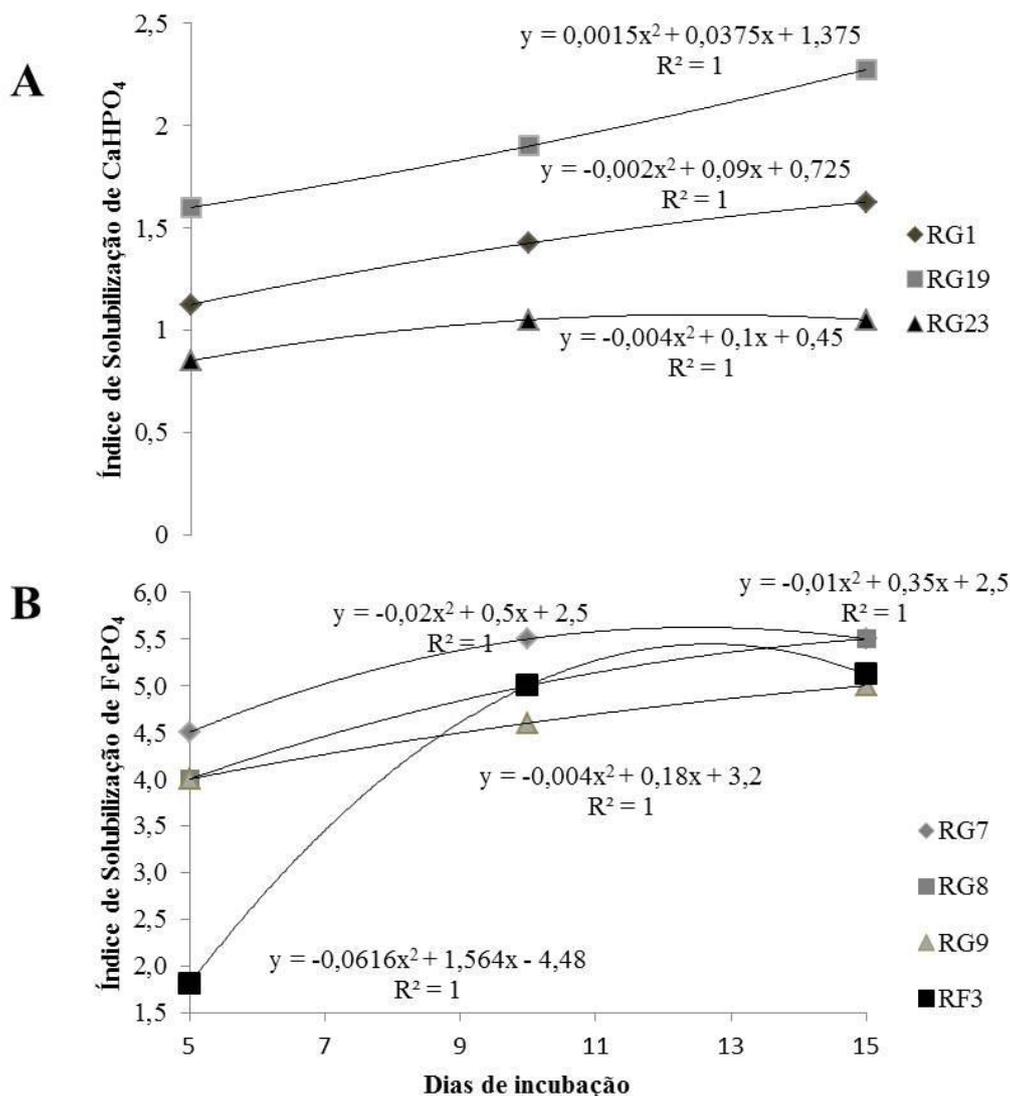


Figura 1. (A) Evolução do Índice de Solubilização de fosfato de cálcio em meio GELP, por linhagens endofíticas bacterianas isoladas de *Hyptis marruboides* Epling, que tiveram $IS > 1$ ao 15º dia de avaliação. (B) Evolução do Índice de Solubilização de fosfato de ferro em meio Reyes por linhagens endofíticas bacterianas, isoladas de *H. marruboides* Epling, que atingiram $IS > 6$ ao 15º dia de avaliação.

Nenhum dos fungos testados demonstrou capacidade solubilizadora de CaHPO_4 , esse dado pode estar relacionado ao fato desses fungos terem sido isolados do sistema radicular de uma nativa do Cerrado, ou seja, uma planta adaptada a solos ácidos, nos quais o P encontra-se complexado ao Fe^{3+} e ao Al^{3+} (Khan *et al.*, 2009). Portanto, é possível que o traço funcional desses fungos esteja relacionado à solubilização de FePO_4 ou AlPO_4 e não CaHPO_4 . De acordo com Illmer *et al.*, (1995) os MSF utilizam estratégias bioquímicas para solubilizar formas inorgânicas de P a formas solúveis, que pode ser a produção de ácidos orgânicos, ou mesmo um mecanismo que envolve o crescimento microbiano e favorece a secreção de prótons (H^+). Além disso, Yadav *et al.*, (2010) isolaram um transportador de fosfato de alta afinidade no endófito radicular *Piriformospora indica*, demonstrando que a presença desse fungo está associada ao suprimento de P à raiz.

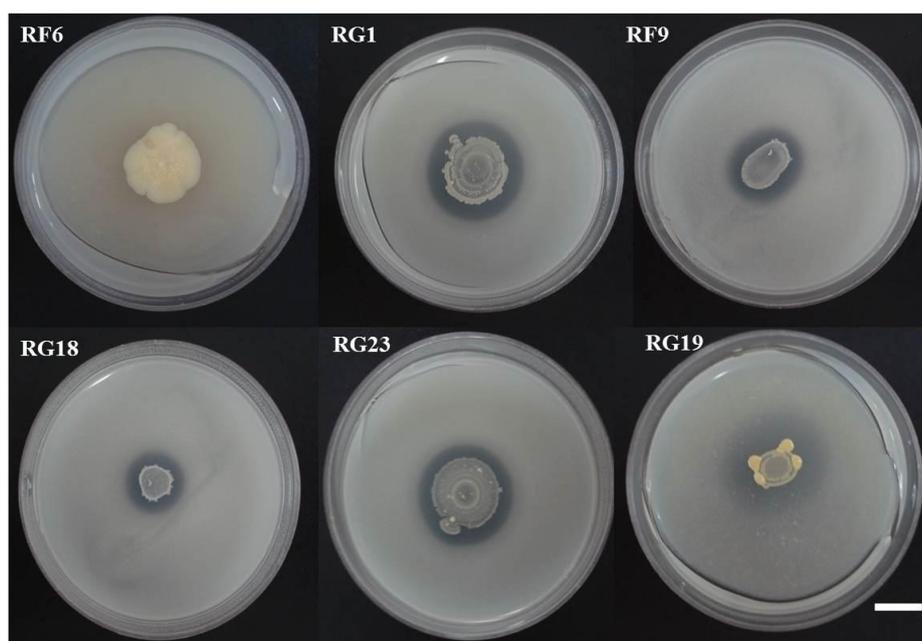


Figura 2. Placas demonstrando variações nos halos de solubilização de CaHPO_4 , formados por diferentes linhagens bacterianas endofíticas radiculares de *Hyptis marrubioides* Epling. Barra = 1 cm.

No teste de solubilização de FePO_4 , foi observado o contrário do ocorrido com o CaHPO_4 , ou seja, mais de 57% dos microrganismos testados formaram halos bastante visíveis, pois sua atividade alterou o pH do meio, evidenciado pela cor do indicador que passou de azul para amarelo (Figura 3). Em trabalho desenvolvido com *Aspergillus*

niger, Yuan *et al.*, (2005) elucidaram que a significativa redução do pH resulta da produção de ácidos orgânicos, como consequência do consumo de açúcar pelo microrganismo. A atividade produtora de ácidos por microrganismos rizosféricos, também foi relacionada a diminuições no pH do meio de cultura, por Bizukoje & Ledakowicz (2004) e Barroso & Nahas (2008). Esses ácidos orgânicos atuam na complexação do cátion do fosfato inorgânico para liberar fosfato solúvel (Whitelaw *et al.*, 1999), o que favorece a disponibilização de P às plantas.

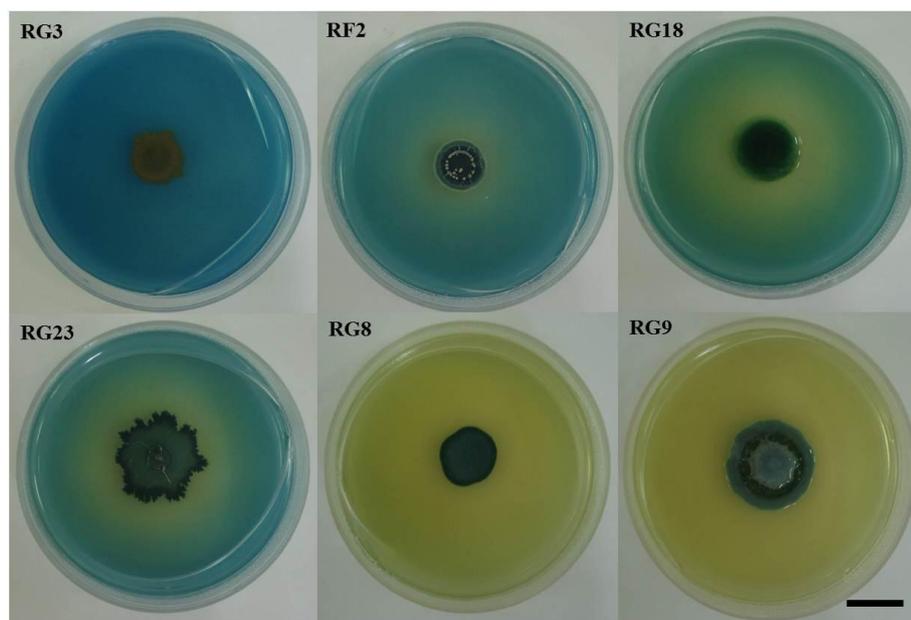


Figura 3. Placas demonstrando variações nos halos de solubilização de FePO_4 , formados por diferentes linhagens bacterianas endofíticas radiculares de *Hyptis marrubioides* Epling. Barras = 1 cm.

Do total de solubilizadores de FePO_4 , 59% apresentaram IS alto ($\text{IS} > 3$), 11% possuem IS médio ($2 < \text{IS} < 3$) e 30%, demonstraram $\text{IS} < 2$. A evolução dos halos formados pela solubilização de FePO_4 pelas linhagens bacterianas foi avaliada a cada cinco dias e analisada para as linhagens que obtiveram $\text{IS} > 6$, a qual também demonstrou comportamento quadrático (Figura 1B). Todos os fungos testados, incluindo *Papulaspora* sp., *Trichoderma* sp. e *Fusarium* sp., demonstraram capacidade solubilizadora de FePO_4 , esse dado está em desacordo com o encontrado por Chai *et al.*, (2011), que isolou microrganismos solubilizadores de fosfato de amostras de solo chinês, e encontrou um *Penicillium* com alta capacidade solubilizadora de rocha

fosfática e fosfato de Al, esse fungo contudo, não solubilizou fosfato de Fe. Rawat & Tewari (2011) exploraram a capacidade de *Trichoderma* sp. na solubilização de fosfato, e também encontraram uma cepa solubilizadora de fosfato de Fe. Para as bactérias que solubilizaram simultaneamente, CaHPO_4 e FePO_4 , os halos, em meio Reyes, foram sempre superiores aos halos em meio GELP (Tabela 1).

O alto percentual de endofíticos solubilizadores de FePO_4 encontrado nas raízes de *Hyptis marrubioides* Epling contrasta com muitos trabalhos atuais que demonstram a solubilização de FePO_4 como pouco satisfatória, se comparada a outros fosfatos. Por exemplo, a solubilização de hidroxiapatita, CaHPO_4 e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ por *Pantoea agglomerans*, uma bactéria rizosférica da soja, foi mais eficiente do que a de FePO_4 e AlPO_4 (Son *et al.*, 2006). Segundo Gibson & Mitchell, (2004) fungos micorrízicos ericóides solubilizaram CaHPO_4 , mas não FePO_4 ou de AlPO_4 . No entanto, mais recentemente, isolados de *A. niger*, obtidas de amostras de solo, mostraram alta habilidade de solubilizar FePO_4 em meio de cultura (Barroso & Nahas, 2005; Barroso & Nahas, 2008).

Muitos trabalhos têm comprovado a existência de coevolução entre espécies endofíticas e seus hospedeiros (Barrett, 1983; Thompson, 1989; Schardl, 1997). O equilíbrio entre os nichos ambientais requer espécies coadaptadas, e as relações simbióticas também exigem indivíduos que evoluíram conjuntamente, caracteres intrínsecos (Schardl, 1997), sejam esses morfológicos, ecofisiológicos, bioquímicos ou demográficos. A baixa disponibilidade de P em solos ácidos, potencialmente produtivos, como os do bioma Cerrado, requer que as plantas se associem simbioticamente com bactérias e fungos adaptados às condições desse solo (Zapata & Axmann, 1995). Exige também, que estes sejam capazes de atuar sobre os complexos que adsorvem fosfato em condições ácidas, que são o FePO_4 e o AlPO_4 (Andrade *et al.*, 2003). A existência de coevolução simbiótica entre a microbiota endofítica e *H. marrubioides* Epling, pode explicar o grande número de solubilizadores de fosfato de ferro isolados de suas raízes. O fato dessa planta ser uma nativa do Cerrado, justifica a alta capacidade de solubilização de FePO_4 evidenciada por seus endofíticos. De acordo com Khan *et al.*, (2009), *Pseudomonas* colonizadoras de raízes possuem um sistema de captação de Fe, com base no lançamento de sideróforos com alta afinidade a este cátion. Além disso, ânions carboxílicos podem substituir o PO_4^{3-} , quelando tanto Fe^{3+} , quanto Al^{3+} , liberando assim o PO_4^{3-} e tornando-o disponível às plantas.

Tabela1. Solubilização de CaHPO₄, FePO₄ e produção de Ácido Indolacético (AIA) por microrganismos endofíticos radiculares de *Hyptis marruboides* Epling.

	Código do isolado	IS _{CaHPO₄} = $\frac{\text{ØH}}{\text{ØC}}$	IS _{FePO₄} = $\frac{\text{ØH}}{\text{ØC}}$	[] de AIA µg mL ⁻¹ de cultura
	Linhagens de endofíticos bacterianos	RG1	1,35a ¹	NS
RG2		NS	5,75b	0,60v
RG3		NS	NS	0,00z
RG4		NS	0,32c	0,00z
RG5		NS	5,10b	2,03o
RG6		NS	NS	0,00z
RG7		NS	6,80a	4,81h
RG8		0,35bC	8,48aA	7,35f
RG9		0,27bC	6,67aA	39,28b
RG10		NS	0,30d	1,17t
RG11		NS	NS	3,67l
RG12		NS	0,30d	4,42i
RG13		NS	NS	1,88p
RG14		0,40bc	NS	2,13n
RG15		0,32bC	5,00bB	0,00z
RG17		NS	NS	0,00z
RG18		0,52bC	3,20cB	0,00z
RG19		1,82 ^a	NS	5,53g
RG20		NS	NS	4,13j
RG21		NS	0,40d	0,00z
RG22		NS	NS	0,00z
RG23		1,49aC	4,30bB	0,00z
RG24		NS	4,10b	11,96d
RG25		NS	0,50d	1,35s
RG26		0,47b	NS	0,00z
RG28		NS	NS	0,00z
RG33		NS	NS	0,00z
RF1		NS	NS	1,38r
RF2		NS	1,90c	0,00z
RF3		NS	6,90a	10,21e
RF4	NS	NS	3,35m	
RF5	NS	5,8a	0,00z	
RF6	NS	NS	0,00z	

Linhagens de endofíticos fúngicos	RF7	NS	NS	0,00z
	RF8	NS	2,4c	0,51y
	RF9	0,54bC	4,60bB	0,00z
	RF10	NS	NS	0,00z
	RF11	NS	NS	0,00z
	RF13	NS	NS	16,21c
	RF15	NS	NS	0,00z
	RF18	0,35bC	4,90bB	95,13a
	RF19	NS	0,40c	1,53q
	RG16	NS	3,00c	NT
	<i>Trichoderma</i> sp.	NS	3,50b	NT
	RG30	NS	3,30c	NT
	<i>Papulaspora</i> sp.	NS	4,00b	NT
	<i>Fusarium</i> sp.	NS	1,20d	NT
	RF20	NS	3,50b	NT

¹Letras minúsculas comparam as linhas e maiúsculas comparam as colunas. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%). ²Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%). NS = não formaram halos de solubilização, NT = linhagens não testadas.

Dentre as 42 linhagens bacterianas testadas para a biossíntese de AIA, 52% demonstraram capacidade de produzir essa auxina. Contudo, essas linhagens se diferenciam com relação ao percentual de produção desse fitormônio em meio DYGS, com triptofano (Tabela 1). Zaharova *et al.*, (1999) afirmaram que 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de produzir AIA. O triptofano funciona como precursor fisiológico para a biossíntese de auxinas em plantas e em microrganismos (Contreras *et al.*, 2010) e a enzima IpdC (indol-3-piruvato decarboxilase-EC 4.1.1.74) é essencial para a biossíntese deste fitormônio (Kochar & Srivastava, 2011).

De modo especial, as linhagens RF18, RG9, RF13 e RG24 sintetizaram quantidades expressivas de AIA nas condições testadas, respectivamente; 95,13; 39,28; 16,21 e 11,96 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 1). Kuss *et al.*, (2007) obtiveram valores entre 2,79 e 13,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$, testando diazotróficas endofíticas, também em meio DYGS. Crozier *et al.*, (1988) avaliaram a produção de AIA por isolados de *A. brasilense*, provenientes de *Zea mays* e obtiveram valores entre 1,4 e 26,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em culturas incubadas por 24 horas a 32 °C. Mascarua-Esparza *et al.*, (1988) detectaram valores de 36,5 a 77 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e 6,5 a 17,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para endofíticos radiculares de cactáceas.

Do ponto de vista biotecnológico, destacaram-se as linhagens RG9, RG24 e RF18 com indicação de alto potencial de solubilização de FePO_4 e produção AIA. Estudos futuros poderão ser desenvolvidos no sentido de identificar essas linhagens, quantificar as solubilizações testadas nesse trabalho, em meio de cultura líquido e também testar a capacidade desses isolados em promover crescimento vegetal, visando sua utilização como inoculantes para solos ácidos.

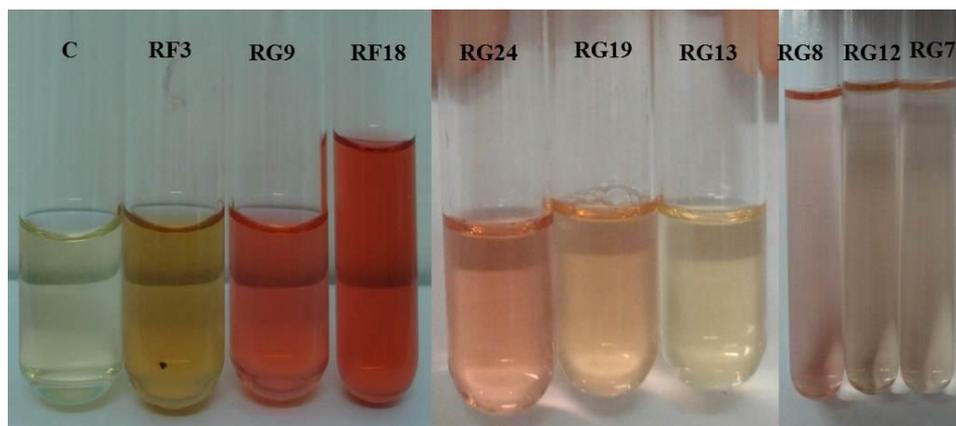


Figura 4. Padrões colorimétricos gerados por isolados bacterianos endofíticos de *H. marruboides* Epling, para quantificação da produção de Ácido Indolacético em meio GYBS enriquecido com triptofano. (C) Controle - meio GYBS na ausência de bactérias.

RESUMO

Solubilização de fosfato de cálcio e de ferro e produção de ácido indolacético *in vitro* por isolados endofíticos de *Hyptis marruboides* Epling (Lamiaceae)

O crescimento e o desenvolvimento vegetal estão associados ao acesso da planta a minerais e fitormônios. Alguns microrganismos solubilizam fosfato, e produzindo fitormônios, como traços funcionais de promotores do crescimento vegetal. Isolados endofíticos da raiz de *Hyptis marruboides* Epling, uma Lamiaceae, foram caracterizados com relação à sua capacidade de solubilizar fosfato de Ca, em meio GELP e fosfato de Fe, em meio basal de Reyes *et al.*, (1999), modificado por Gadagi & Sa (2002). Foram caracterizados também quanto à capacidade de biossintetizar Ácido Indolacético (AIA) em meio GYBS, enriquecido com triptofano. Nos testes de solubilização, foram analisadas 42 linhagens bacterianas e seis linhagens fúngicas. Do

total, 20% formaram halos de solubilização de CaHPO_4 , embora essa solubilização tenha sido de nível baixo. Nenhum dos fungos testados solubilizou CaHPO_4 . Um percentual de 59% dos microrganismos atingiram níveis altos de solubilização de FePO_4 , sendo que todos os fungos demonstraram essa capacidade. No teste de biossíntese de AIA, foram testados apenas os isolados bacterianos, sendo que 52% destes sintetizaram esse composto, destacando-se as linhagens RF18, RG9, RF13 e RG24 que apresentaram doses expressivas do fitormônio nas condições testadas, respectivamente: 95,13; 39,28; 16,21 e 11,96 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Do ponto de vista biotecnológico, destacam-se as linhagens RG9, RG24 e RF18 por apresentarem alto potencial de solubilização de FePO_4 e produção de AIA.

Palavras-chave: halos de solubilização, microrganismos solubilizadores de fosfato, ácido indolacético, promotores do crescimento vegetal.

REFERÊNCIAS

1. Almeida, D.; Filho, O.K.; Felipe, A.F.; Almeida, H.C. (2009). Carbono, nitrogênio e fósforo microbiano do solo sob diferentes coberturas em pomar de produção orgânica de maçã no sul do Brasil. *Bragantia*, 68 (4), 1069-1077.
2. Andrade, F.V.; Mendonça, E.S.; Alvarez, V.H.; Novais, R.F. (2003). Adição de ácidos orgânicos e húmicos em latossolos e adsorção de fosfato. *R. Bras. Ci. Solo*, 27, 1003-1011.
3. Arrigoni-Blank, M.F.; Antonioli, A.R.; Caetano, L.C.; Campos, D.A.; Blank, A.F.; Alves, P.B. (2008). Antinociceptive activity of volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. *Phytomedicine*, 15, 334-339.
4. Assumpção, L.C.; Lacava, P.T.; Dias, A.C.F.; Azevedo, J.L.; Menten, J.O.M. (2009). Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesq. Agropec. Bras.*, 44 (5), 503-510.
5. Banik, S.; Dey, B.K. (1982). Available phosphate content of an Alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate solubilizing microorganisms. *Plant Soil*, 69, 353-364.
6. Barrett, J. A. (1983). Plant-fungus symbioses. p. 137-139. In: D. J. Futuyma and M. Slatkin, eds. *Coevolution*. Sinauer, Sunderland, Mass.

7. Barroso, C.B.; Nahas, E. (2008). Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. *Pesq. Agropec. Bras.*, 43 (4), 529-535.
8. Barroso, C.B.; Nahas, E. (2005). The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Appl. Soil Ecol.*, 29, 73-83.
9. Berraqueiro, F.R.; Baya, A.M. & Cormenzana, A.R. (1976). Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *ARS Farmacéutica*, 17, 399-406.
10. Bizukojc, M.; Ledakowicz, S. (2004). The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. *Process Biochem.*, 39, 2261-2268.
11. Chagas Jr., A.F.; Oliveira, L.A.; Oliveira, A.N.; Willerding, A.L. (2010). Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. *Acta Sci. Agron.*, 32 (2), 359-366.
12. Chai, B.; Wu, Y.; Liu, P.; Liu, B.; Gao, M. (2011). Isolation and phosphate-solubilizing ability of a fungus, *Penicillium* sp. from soil of an alum mine. *J. Basic Microbiol.*, 51 (1), 5-14.
13. Contreras, A.R.; Dorantes, A.R.; Villafán, S.M.; Jiménez, S.P.; Tovar, A.R.; Zúñiga, L.A.G. (2010). Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Polibotánica*, 29, 131-147.
14. Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.M.; Lima, E.O.; Siqueira-Junior, J.P. (2009). *In vitro* phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 96, 63-65.
15. Crozier, A.; Arruda, P.; Jasmim, J.M.; Monteiro, A.M.; Sandberg, G. (1998). Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture media from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2833-2837.
16. Da Silveira, E.L. Inoculações de bactéria promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva. 2008. 83p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
17. Dobbelaere, S.; Vanderleyden, J.; Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 22, 107-149.

18. Doyle, L.M.G.; Scharf, R. & Silva Filho, G.N. (1990). Avaliação da população e do potencial de microrganismos solubilizadores de fosfatos de solos cultivados com fruteiras temperadas em Santa Catarina. *Biotemas*, 2, 59-76.
19. El-Khawas, H.; Adach, K. (1999). Identification and quantification of auxins in culturemedia of *Azospirillum* and *Klebsiela* and their effect on rice roots. *Biol. Fert. Soils*, 28, 377-381.
20. Ferreira, D.F. (2003). *Sisvar*: versão 4.2. Lavras: UFLA.
21. Friezer, M.L.; Porter, S.S.; Stark, S.C.; Wetteberg, E.J.; Sachs, J.L.; Martinez-Romero, E. (2011). Microbially Mediated Plant Functional Traits. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 42, 23-46.
22. Gadagi, R.S.; Sa, T. (2002). New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminum phosphates using dyes. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 48 (4), 615-618.
23. Gibson, B.R.; Mitchell, D.T. (2004). Nutritional influences on the solubilization of metal phosphate by ericoid mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.*, 108, p.947-954.
24. **Gordon, S.A.; Weber, R.P. (1951). Colorimetric estimation of Indoleacetic Acid. *Plant Physiol.*, 26, 192-195.**
25. Gray, E.J.; Smith, D.L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant – bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.*, 37, 395-412.
26. Harrison, M. J.; van Buuren, M. L. (1995). A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature*, 378, 626–629.
27. Hartmann, A.; Singh, M.; Klingmuller, W. (1983). Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indole acetic acid. *Can. J. Microbiol.*, 29, 916-923.
28. Illmer, P.; Barbato, A.; Schinner, F. (1995). Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.*, 27, 265-270.
29. Kang, S. C.; Ha, C. G.; Lee, T. G.; Maheshwari, D. K. (2002). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS 102. *Current Science*, 82 (4), 439-442.
30. Khan, A.A.; Jilani, G.; Akhtar, M.S.; Naqvi, S.M.S.; Rasheed, M. (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *J. Agric. Biol. Sci.*, 1 (1), 48-58.

31. Kieffer, M.; Neve, J.; Kepinski, S. (2010). Defining auxin response contexts in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13** (1), 12-20.
32. **Kochar, M.; Srivastava, S. (2011).** Surface colonization by *Azospirillum brasilense* SM in the indole-3-acetic acid dependent growth improvement of sorghum. *J. Basic Microbiol.*, 51: n/a. doi: 10.1002/jobm.201100038.
33. Kuss, A.V.; Kuss, V.V.; Lovato, T.; Flôres, M.L. (2007). Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesq. Agropec. Bras.*, 42 (10), 1459-1465.
34. Mascarua-Esparza, M.A.; Villa-Gonzalez, R.; Caballero-Melado, J. (1988). Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from cactaceous plants. *Plant and Soil*, 106, 91-95.
35. Mehnaz, S. (2011). Plant Growth-Promoting Bacteria Associated with Sugarcane. *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*, 165-187.
36. Multani, D.S.; Briggs, S.; Chamberlin, M.A.; Blakeslee, J.J.; Murphy, A.S.; Johal, G. (2003). Control of plant height in maize by an ABC transporter of the multi-drug resistance class. *Science*, 302, 81-84.
37. Morrissey, J.; Guerinot, M.L. (2009). Iron uptake and transport in plants: the bad, the good and the ionome. *Chem. Rev.*, 109, 4553-4567.
38. Nakayama, L.H.I.; Caceres, N.T.; Alcarde, J.C.; Malavolta, E. (1998). Eficiência relativa de fontes de fósforo de diferentes solubilidades na cultura do arroz. *Sci. Agric.*, 55 (2), 183-190.
39. Payne, G.W.; Ramettez, A.; Rose, H.L.; Weightman, A.J.; Jones, T.H.; Tiedje, J.M.; Mahenthiralingam, E. (2006). Application of a recA gene-based identification approach to maize rhizosphere reveals novel diversity in Burkholderia species. *Fems Microbiol. Lett.*, 259, 126-132.
40. Pedrinho, E.A.N.; Galdiano Junior, R.F.; Campanharo, J.C.; Alves, L.M.C.; Lemos, E.G.M. (2010). Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. *Bragantia*, 69 (4), 905-911.
41. Rawat, R.; Tewari, L. (2011). Effect of abiotic stress on phosphate solubilization by biocontrol fungus *Trichoderma* sp. *Curr. Microbiol.*, 62 (5), 1521-1526.
42. Reinhardt, D.; Pesce, E.R.; Stieger, P.; Mandel, T.; Baltensperger, K.; Bennet, M.; Traas, J.; Friml, J.; Kuhlemeier, C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, 426, 255-260.

43. Reyes, I.; Bernier, L.; Simard, R.R.; Antoun, H. (1999). Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV: induced mutants. *Fems Microbiol. Lett.*, 28, 281-290.
44. Rodriguez Neto, J.; Malavolta Junior, V.A. Victor, O. (1986). Meio Simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *Citri* tipo B. *Summa Phytopathol.*, 12, 16.
45. Rodrigues, V.E.G.; Carvalho, D.A. (2001). Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domíniodo cerrado na região do alto Rio grande –Minas Gerais. *Ciênc. Agrotec.*, 25 (1), 102-123.
46. Rosenblueth, M.; Martinez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microorg. Interact.*, 8, 827-837.
47. Santos, D.H.; Tiritans, C.S.; FOLONI, J.S.S.; Fabris, L.B. (2010). Produtividade de cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. *Pesq. Agropec. Trop.*, 40 (4), 454-461.
48. Sarwar, M.; Kremer, R.J. (1995). Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Lett. Appl. Microbiol.*, 20, 282-285.
49. Schardl, C.L.; Leuchtman, A.; Chung, K.; Penny, D.; Siegel, M.R. (1997). Coevolution by Common Descent of Fungal Symbionts (*EpichZoZ* spp.) and Grass Hosts. *Mol. Biol. Evol.*, 14 (2), 133-143.
50. Silva, A.C.S.; Chagas Junior, A.F.; Oliveira, L.A.; Chagas, L.F.B. (2011). Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de plantas de importância econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. *J. Biotec. Biodivers.*, 2 (1), 37-42.
51. Silva, M.F.; Oliveira, P.J.; Xavier, G.R.; Rumjanek, N.G.; Reis, V.M. (2009). Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. *Pesq. Agropec. Bras.*, 44 (11), 1437-1443.
52. Sylvester-Bradley, R.; Asakawa, N.; Latorraca, S.; Magalhães, F. M. M.; Oliveira, L.A.; Pereira, R. M. (1982). Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na amazônia. *Acta Amazonica*, 12, 15-22.
53. Son, H.J.; Park, G.T.; Cha, M.S.; Heo, M.S. (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Biores. Technol.*, 97, 204-210.
54. Thompson, N. (1989). Concepts of coevolution. *Trends Ecol. Evol.*, 4, 179-183.

55. Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting Rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586.
56. Whitelaw, M.A.; Harden, T.J.; Helyar, K.R. (1999). Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol. Biochem.*, 31, 655-665.
57. Yadav, V.; Kumar, M.; Deep, D.K.; Kumar, H.; Sharma, R.; Tripathi, T.; Tuteja, N.; Saxena, A.K.; Johri, A.K. (2010). A phosphate transporter from the root endophytic fungus *Piriformospora indica* plays a role in phosphate transport to the host plant. *J. Biol. Chem.*, 285 (34), 26532-26544.
58. Yuan, Q.P.; Wang, J.D.; Zhang, H.; Qian, Z.M. (2005). Effect of temperature shift on production of xylanase by *Aspergillus niger*. *Process Biochem.*, 40, 3255-3257.
59. Zakharova E.A., Scherbakov, A.A., Brudnik, A.V., Skripko, N.G., Bulkhin, N.S., Ignatoy, V.V. (1999). Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. *Eur. J. Biochem.*, 259, 572-576.
60. Zapata, F.; Axmann, H. (1995). ³²P isotopic techniques for evaluating the agronomic effectiveness of rock phosphate material. *Nutr. Cycl. Agroecosys.*, 41, 189-195.

**RESPOSTA METABÓLICA INDUZIDA POR FUNGOS E BACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS EM MICROPLANTAS DE *Hyptis marruboides* Epling**

ABSTRACT

Metabolic answer induced by endophytic fungi and bacteria in microplants of *Hyptis marruboides* Epling

The elicitors mechanisms, through the induction of answers of resistance, can lead to the accumulation of secundar metabolites in vegetal issues, since they have their synthesis stimulated in the presence of the elicitor. *Hyptis marruboides* Epling is a medical Lamiaceae, native from Brazilian “Cerrado”, for which there are no data related to its elicitation. This work evaluated the metabolic answer of microplants of this specie to the inoculation of four bacterial and three fungal endophytic isolates, used as biotic elicitors, and compared this answer to the answers of plants of *Hyptis marruboides* Epling grown in *ex vitro* conditions. In the *in vitro* system, two of the endophytic bacteria tested and the three fungi behaved as pathogens. The bacteria provoked wilt symptoms, foliar fall and root darkening, while the fungi provoked just wilt. The vegetal extracts of the samples were evaluated by CLAE-DAD and CG/EM. The CLAE analysis revealed two major peaks, being one of them corresponding to the flavonoid quercetin-7-O- glycoside and another one corresponding to the chlorogenic acid, 3,4-O-dicaffeoylquinic acid. On the microplants was detected a low concentration of the flavonoid, when compared to the *ex vitro* plant and the treatment with the *Fusarium* fungus was the most efficient in stimulating the biosynthesis of the chlorogenic acid. The analysis with CG/EM showed, in general, a high diversity of methyl esters of fatty acids, and some of the metabolites, such as 7- Tetradecine and neofitadien only appeared in the treatments where the elicitation happened. Besides, the metabolite heptametil-hexadecane was biosynthesized specifically in treatment with bacterium in contrast with 4-nonenol; 14-Heptadecane, chloride of 9,12-Octadecadienoil, and 1,1'-Biciclopentil, 2-hexadecil, detected only in treatments with fungi.

Key words: elicitation, *in vitro* culture, secundar metabolites.

INTRODUÇÃO

Muitos são os mecanismos atualmente utilizados para induzir respostas de resistência em plantas. Esses métodos consistem na ativação de mecanismos de defesa latentes do vegetal, que aumentam sua habilidade em prevenir ou retardar o estabelecimento dos microrganismos fitopatogênicos (Alves, 2007). As defesas pós-formadas podem ser acionadas por exposição a agentes indutores, que funcionam como elicitores da resposta de defesa (Choudhary *et al.*, 2007). A indução de resistência inclui muitas vezes o acúmulo de metabólitos secundários nos tecidos vegetais (Alwis *et al.*, 2009), a produção de fitoalexinas com propriedades antimicrobianas, por parte da planta (Barros *et al.*, 2010), ou a biossíntese de compostos ativos por parte de microrganismos. Um exemplo disso é a produção da subtilina, antibiótico produzido pelo *Bacillus subtilis*, uma espécie de bactéria saprofítica, gram-positiva, que é comum no solo, no estercó e nos biofertilizantes. Esse composto pode agir de forma deletéria sobre ácaros fitoparasitas e insetos fitófagos sugadores e também sobre os fitopatógenos causadores de doenças de plantas (Barbosa & Medeiros, 2007).

Os elicitores podem ser de natureza química ou biológica, tais como microrganismos não patogênicos (Coqueiro *et al.*, 2011), formas avirulentas ou raças incompatíveis de um patógeno, ou patógenos virulentos. São utilizados também filtrados de culturas fúngicas (Hwang *et al.*, 2011), extrato de levedura (Chong *et al.*, 2005) e polissacarídeos de parede de microrganismos (Guzzo *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 2009). Microrganismos rizosféricos também têm sido testados como agentes indutores e a eficiência de rizobactérias promotoras de crescimento, extensivamente estudada (Teixeira *et al.*, 2005). Os principais determinantes bacterianos de indução de resistência sistêmica, que podem funcionar como elicitores, são os lipopolissacarídeos presentes na membrana (LPS), sideróforos, ácido salicílico e ácido jasmônico (Sharma *et al.*, 2011).

Trabalhos têm mostrado que fungos costumam associar-se simbioticamente com plantas hospedeiras, de forma a contribuir para a promoção do crescimento e acúmulo de metabólitos secundários simultaneamente. Estes podem ser alcalóides ou terpenóides com características farmacológicas (Zhi-lin *et al.*, 2007). O trabalho de Osbourne (2010) demonstra a existência de genes do metabolismo secundário, que são comuns a plantas e microrganismos.

A cultura de tecidos é uma ferramenta bastante útil para a reprodução de explantes com características desejáveis, tais como: resistência a pragas e outras

condições de estresse, alta produtividade e elevado rendimento de substâncias ativas de interesse (Srivastava & Srivastava, 2007). A elicitação *in vitro* têm se mostrado um eficiente processo biotecnológico para indução e obtenção de metabólitos secundários a partir de células ou tecidos vegetais. Chong *et al.*, (2005) utilizaram extrato de levedura, ácido jasmônico, micélios homogenizados de *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*, quitosana e glucano em suspensões celulares de *Morinda elliptica* (Hook.f.) Ridl. Estes elicitores tiveram efeitos diferentes sobre a produção de antraquinona. Extrato de levedura incrementou o conteúdo intracelular dos alcalóides escopolamina e hiosciamina (cerca de 3 vezes) em culturas radiculares de *Brugmansia candida* (Pitta-Alvarez, 2000). No trabalho de Naoumkina *et al.*, (2008), o uso de extrato de levedura em culturas celulares de *Medicago truncatula*, induziu o acúmulo de flavonóides e triterpenos, moléculas relacionadas à defesa.

Diversas espécies do gênero *Hyptis* (Lamiaceae) ocorrem no Cerrado brasileiro, muitas apresentando propriedades medicinais e relevância farmacêutica (Arrigoni-Blank *et al.*, 2008; Coutinho *et al.*, 2009). A espécie *Hyptis marrubioides* Epling é uma medicinal, nativa dessa região (Rodrigues & Carvalho, 2001), para a qual não existem dados científicos sobre elicitação, apesar dessa planta ter chamado atenção por concentrar em seu óleo essencial terpenóides como a cariofila-4(14),8(15)-dien-5b-ol, a eudesma-4(15),7-dien-1b-ol, o óxido de cariofileno e o (β)-cariofileno (Sales *et al.*, 2007). Este trabalho tem por objetivo avaliar o perfil fitoquímico de microplantas de *Hyptis marrubioides* Epling expostas à inoculação de isolados endofíticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção, estabelecimento *in vitro* e manutenção do material vegetal

Foram utilizadas plântulas previamente estabelecidas, via germinação *in vitro* de sementes aptas à inoculação obtidas na fazenda Três Barras – Lavras, MG. As sementes foram conduzidas ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IF Goiano – Campus Rio Verde, desinfestadas com álcool 70% (v/v)/ 30 seg, seguido de hipoclorito de sódio (2,5%) de cloro ativo (v/v)/ 20 min, e inoculadas em meio de cultura MS (50% das concentrações dos sais) (Murashige & Skoog, 1962). As plântulas obtidas foram repicadas, utilizando-se como explantes, segmentos caulinares com aproximadamente um cm de altura, e mantidas em MS 50%. As culturas foram incubadas em sala de crescimento por 45 dias, a $0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), temperatura média de 25 °C e fotoperíodo de 16 horas.

Preparo dos inoculantes

- Crescimento e inoculação dos isolados bacterianos

Como inoculantes bacterianos foram selecionados os isolados RG8 – cocos simples, gram positivos, catalase negativa; RG12 – coco-bacilos, gram positivos, catalase negativa; RF10 – coco-bacilos, gram positivos, catalase negativa e RF11 – bacilo grande, gram positivo, catalase negativa. Esses isolados foram cultivados em caldo nutriente (extrato de carne, 3g; peptona, 5g e H₂O q.s.p. 1L), *over night*, a 30 °C, sob agitação de 150 rpm. Posteriormente, alíquotas de 15µL das culturas foram inoculadas nas proximidades das raízes das microplantas de *Hyptis marrubioides* Epling que cresciam em meio MS 50%. Como controle, foram inoculados 15µL de caldo nutriente axênico.

- Crescimento e inoculação dos isolados fúngicos

As linhagens fúngicas utilizadas como elicitores foram RG29 – *Trichoderma sp.*, RG31 – *Papulaspora sp.* e RG32 – *Fusarium sp.* Esses fungos cresceram em BDA sólido (Infusão de 200g de batata; dextrose, 20g; ágar, 15g e H₂O q.s.p. 1L) e tiveram suas colônias fragmentadas, utilizando-se o fundo de ponteiros de 1000µL. Esta fragmentação gerou discos com 5mm de diâmetro. Estes discos foram então inoculados nas proximidades do colo de microplantas de *Hyptis marrubioides* Epling que cresciam em meio MS 50%. Como controle, foram utilizados discos de BDA sem presença de micélio.

Condições de cultivo

Os elicitores foram inoculados em microplantas de *Hyptis marrubioides* Epling com 45 dias de estabelecimento em MS 50%. Após a inoculação, os frascos com as culturas foram mantidos em BOD, a 15 µmol m⁻² s⁻¹ PAR, temperatura média de 30 °C e fotoperíodo de 16 horas. As plantas foram avaliadas diariamente quanto ao aparecimento de sintomas de patologias, sendo que as submetidas à inoculação dos isolados bacterianos tiveram sua parte aérea coletada ao 10º dia de inoculação e as submetidas aos isolados fúngicos, ao 5º dia de inoculação. Essas partes aéreas, bem como as de plantas de *Hyptis marrubioides* Epling cultivadas *ex vitro*, foram secas em estufa de ventilação forçada a 35 °C até atingirem massa constante. Em seguida, foram conduzidas ao Laboratório de Produtos Naturais da Universidade de Franca, para análise do perfil fitoquímico.

Análise da constituição química dos extratos vegetais de plantas *ex vitro* para obtenção dos padrões

- Preparação do extrato bruto e Partição líquido-líquido

Foram utilizadas as partes aéreas de plantas de *Hyptis marruboides* Epling cultivadas *ex vitro*, estas foram secas e moídas, obtendo-se 502g de pó, o qual foi extraído em EtOH exaustivamente. Após a concentração em evaporador rotativo, obteve-se 26,10 g do extrato bruto. O extrato etanólico (20g) foi dissolvido na mistura MeOH/H₂O (2:8, v/v) e sucessivamente particionado com *n*-hexano, acetato de etila, *n*-butanol. Após a remoção do solvente sob pressão reduzida, as seguintes frações foram obtidas *n*-hexânica (H1, 4,01g); acetato de etila (H2, 3,67g); *n*-BuOH (H3, 6,28 g) e Hidroalcolólica (H4, 2,16 g).

- Fracionamento da fração acetato de etila para o isolamento dos padrões

A fração em acetato de etila (H2) 3,67g foi inicialmente cromatografada em coluna de sílica gel Merck (h= 30 cm; ϕ = 3,5 cm), empregando-se como eluente misturas de hexano /AcOEt (98:2 v,v) \rightarrow (1:1 v/v); AcOEt e MeOH, obtendo-se 66 frações. A fração H2-65 (1,61g-MeOH) foi recromatografada em coluna de sephadex LH-20[®] marca Sigma-Aldrich (h = 37,5 cm; ϕ = 3,0 cm), empregando-se como eluente MeOH e a mistura MeOH:H₂O (1:1 v/v). A fração H2-65-25 obtida foi purificada por CCDP (Cromatografia em Camada Delgada Preparativa) eluente: CHCl₃:MeOH:H₂O (43:37:20 v/v/v), permitindo a obtenção da fração H2-65-1 (18 mg), a qual foi utilizada como padrão nas análises quantitativas realizadas via CLAE-DAD, para as microplantas inoculadas com os microrganismos endofíticos e para as microplantas controle, em comparação com as plantas *ex vitro* de *Hyptis marruboides* Epling.

- Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram obtidos em um espectrofotômetro Varian 500 e 400 MHz, empregando-se TMS (tetrametilsilano) como padrão interno. Os espectros de (1) foram obtidos em DMSO-*d*₆ marca Sigma-Aldrich[®] e os espectros de (2) em CD₃OD marca Sigma-Aldrich[®].

- Análises quantitativas por CLAE-DAD

As análises quantitativas realizadas por CLAE-DAD foram desenvolvidas em um cromatógrafo de sistema binário SHIMADZU Prominence-LC-6AD, equipado com

um injetor manual, com loop de 20 μL , acoplado a um detector Diode Array Prominence SPD-M20A. Condição de análise: CLAE analítica, coluna Phenomenex, C-18, 250 x 4,6 mm, 5 μ , equipada com pré-coluna, volume de injeção: 20 μL , fluxo: 1,0 mL/min e Fase Móvel: $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{HAc}$ (40:59,9:0,1, v/v/v) gradiente linear até 100% CH_3OH em 30 minutos, 10 minutos em 100% de CH_3OH e 15 minutos para retornar à condição inicial, λ 230, 254 e 325 nm. O flavonóide (**1**) e o ácido (**2**) foram utilizados como padrões externos.

- Preparo das soluções estoque e construção da curva dos padrões externos

A solução do flavonóide (**1**) e do ácido (**2**) foram preparadas em MeOH grau HPLC (2 mg/mL). Diluições da solução estoque foram realizadas em MeOH grau HPLC para obter soluções contendo 0,05; 0,109; 0,218; 0,436; 0,872 mg mL^{-1} de **1** e 0,102; 0,203; 0,406; 0,813; 1,626 mg mL^{-1} de **2**, as quais foram injetadas em triplicata. Uma curva de calibração de quatro pontos foi construída para determinar a linearidade do método. A curva de calibração foi obtida plotando a área do pico versus a concentração da substância em mg mL^{-1} .

- Análises por CG/EM

Após a reação de esterificação com o diazometano, os extratos das microplantas de *Hyptis marruboides* Epling inoculadas com os microrganismos elicitores e as microplantas controle, foram analisadas em equipamento Shimadzu modelo QP-2010 (baixa resolução). Foi utilizada coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 μm de filme), gás de arraste He a fluxo 1,1 mL min^{-1} , Split 1:10. A temperatura do injetor foi ajustada em 250 $^{\circ}\text{C}$ e a temperatura do forno foi controlada de 100 a 290 a 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, permanecendo em 290 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Os espectros de massas, obtidos a 70eV, foram comparados com os das Bibliotecas Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 através do software GCMS Solution (Shimadzu), que forneceu o índice de similaridade (SI), expresso em porcentagem.

- Preparo das amostras para a análise por CG/EM

Os extratos dos diferentes tratamentos testados foram preparados empregando-se 25 mg do pó, obtido das partes aéreas, em 3 mL de acetato de etila P.A. (Synth). Após 20 min de banho de ultrassom, as amostras foram filtradas, obtendo-se os respectivos extratos brutos.

- Reação de esterificação

Os extratos obtidos foram dissolvidos em éter etílico e resfriados em banho de gelo. A seguir, uma solução de diazometano foi adicionada às amostras até não se observar a evolução de gás N₂. Para a preparação da solução de diazometano, dissolveu-se 2,24g de N-metil-N-nitroso-4 toluenosulfonamida em 30 mL de éter etílico, e adicionou-se 0,4g de KOH em 10 mL de etanol, resfriando-se a solução final empregando-se um banho de gelo. Após 5 min, destilou-se a solução etérea de diazometano, utilizando-se um banho de aquecimento da mistura racional e recolheu-se o produto formado (diazometano) sobre éter etílico resfriado em banho de gelo. Essa reação foi realizada com o objetivo de se identificar ácido jasmônico nas amostras.

Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 11 tratamentos (Tabela 1). Cada frasco de cultivo foi considerado uma unidade amostral, sendo que cada frasco continha quatro microplantas. As amostras foram analisadas em triplicada. As médias para o aparecimento de sintomas bem como as de quantificação do flavonóide quercetina -7-*O*-glicosídeo e do ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico, obtidas pelas análises por CLAE-DAD, foram submetidas a teste Tukey (5%), com o auxílio do software estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

Tabela 1. Tratamentos utilizados no estudo fitoquímico da planta cultivada *ex vitro* e das microplantas de *Hyptis marruboides* Epling após sua exposição aos microrganismos elicitores.

		Tratamento	
Plantas	1	Planta <i>ex vitro</i>	
	2	Microplanta	
	3	Microplanta + caldo nutriente	
Elicitação bacteriana	4	Microplanta + RF11	
	5	Microplanta + RG8	
	6	Microplanta + RF10	
	7	Microplanta + RG12	
	8	Microplanta + BDA	
Elicitação Fúngica	9	Microplanta + <i>Trichoderma sp.</i>	
	10	Microplanta + <i>Papulaspora sp.</i>	

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da incidência de sintomas de doença foi realizada diariamente e para a análise estatística observou-se a última, das 10 avaliações realizadas nas plantas que sofreram inoculação de bactérias e a última das cinco avaliações realizadas nas plantas que sofreram inoculação de fungos. As bactérias RF11 e RG8 foram bastante virulentas, desencadeando murcha, morte descendente da folha e escurecimento radicular, sendo que a primeira provocou murcha em 100% das microplantas inoculadas (Tabela 2). Esses caracteres têm sido descritos como sintomas típicos de bacterioses (Nery-Silva *et al.*, 2007; Zoccoli *et al.*, 2009).

O fungo *Papulaspora sp.* também provocou murcha generalizada nas microplantas, contudo, não desencadeou queda foliar, assim como as outras espécies de fungos testados. Na presença das bactérias RF10 e RG12, as plantas não apresentaram sintoma aparente de patologia (Figura 1).

Tabela 2. Sintomas de patogenia provocados por bactérias (ao 10º dia de inoculação) e fungos (ao 5º dia de inoculação) endofíticos utilizados como elicitores em microplantas de *Hyptis marruboides* Epling.

Tratamento	% de plantas com murcha	% de plantas com queda foliar	Coloração das raízes
Microplanta	0d*	0b	Clara
Microplanta + caldo nutriente	0d	0b	Clara
Microplanta + RF11	100a	80a	Escura
Microplanta + RG8	80b	80a	Escura
Microplanta + RF10	0d	0b	Clara
Microplanta + RG12	0d	0b	Clara
Microplanta + BDA	0d	0b	Clara
Microplanta + <i>Trichoderma sp.</i>	30c	0b	Clara
Microplanta + <i>Papulaspora sp.</i>	100a	0b	Clara
Microplanta + <i>Fusarium sp.</i>	30c	0b	Clara

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não se diferem pelo teste Tukey (5%).

De acordo com Lanna Filho *et al.*, (2010), dos mecanismos bioquímicos de resistência pós-formados, dois se destacam por apresentarem amplo espectro de ação: a

resistência sistêmica adquirida (SAR) e a resistência sistêmica induzida (ISR), que podem ser ativadas por microrganismos. Ambas são reguladas pela proteína NPR1, onde se cruzam na rota de sinalização (Choudhary *et al.*, 2007). No entanto, as rotas de sinalização são distintas, pois SAR é governada pela rota do ácido salicílico e ISR pela rota do ácido jasmônico e etileno. Conforme Pieterse *et al.*, (1998), a indução salicilato-dependente pode resultar em alterações visuais (necroses, por exemplo) na planta que teve seus mecanismos de defesa ativados.

Com isso, conclui-se que as bactérias RF11 e RG8, bem como os fungos, *Trichoderma sp.*, *Papulaspora sp.* e *Fusarium sp.*, mesmo sendo linhagens endofíticas, isoladas da raiz de *Hyptis marruboides* Epling, no sistema *in vitro*, passaram a atuar como patógenos. Comportamento comprovado pelo aparecimento de sintomas visuais, nas plantas afetadas. O comportamento simbiótico dos endofíticos está diretamente relacionado às condições do ambiente e ao estado fisiológico do hospedeiro, podendo, em condições adversas, manifestarem-se como patógenos. Nesse caso, o endofítico pode ser considerado um patógeno latente (Azevedo, 1998; Roldão & Pfenning, 2001).

Os gêneros *Trichoderma*, *Papulaspora* e *Fusarium* são gêneros comuns em simbioses endofíticas (Errasti *et al.*, 2010). Há poucos relatos sobre patogenicidade de espécies desses gêneros no sistema *in vitro* (Almeida *et al.*, 2005). Espécies de *Trichoderma* têm sido utilizadas no controle biológico de fitopatógenos, podendo esse controle ser realizado por micoparasitismo ou antibiose (Ownley *et al.*, 2010). O gênero *Papulaspora*, também tem demonstrado atividade antimicrobiana (Ramos *et al.*, 2010), além de potencial para a obtenção de metabólitos secundários (Gallo *et al.*, 2010). Por outro lado, o gênero *Fusarium* é conhecido por desencadear a murcha por *Fusarium*, ou Fusariose, caracterizada por hipertrofia de xilema (Pinto *et al.*, 2010) e murcha seguida de morte nas plantas acometidas (Costa *et al.*, 2010). Estes sintomas foram observados nas plantas do tratamento 7 (RG32), que foram submetidas à inoculação de *Fusarium* (Figura1), comprovando que esse endofítico se comportou patogenicamente no sistema *in vitro*.

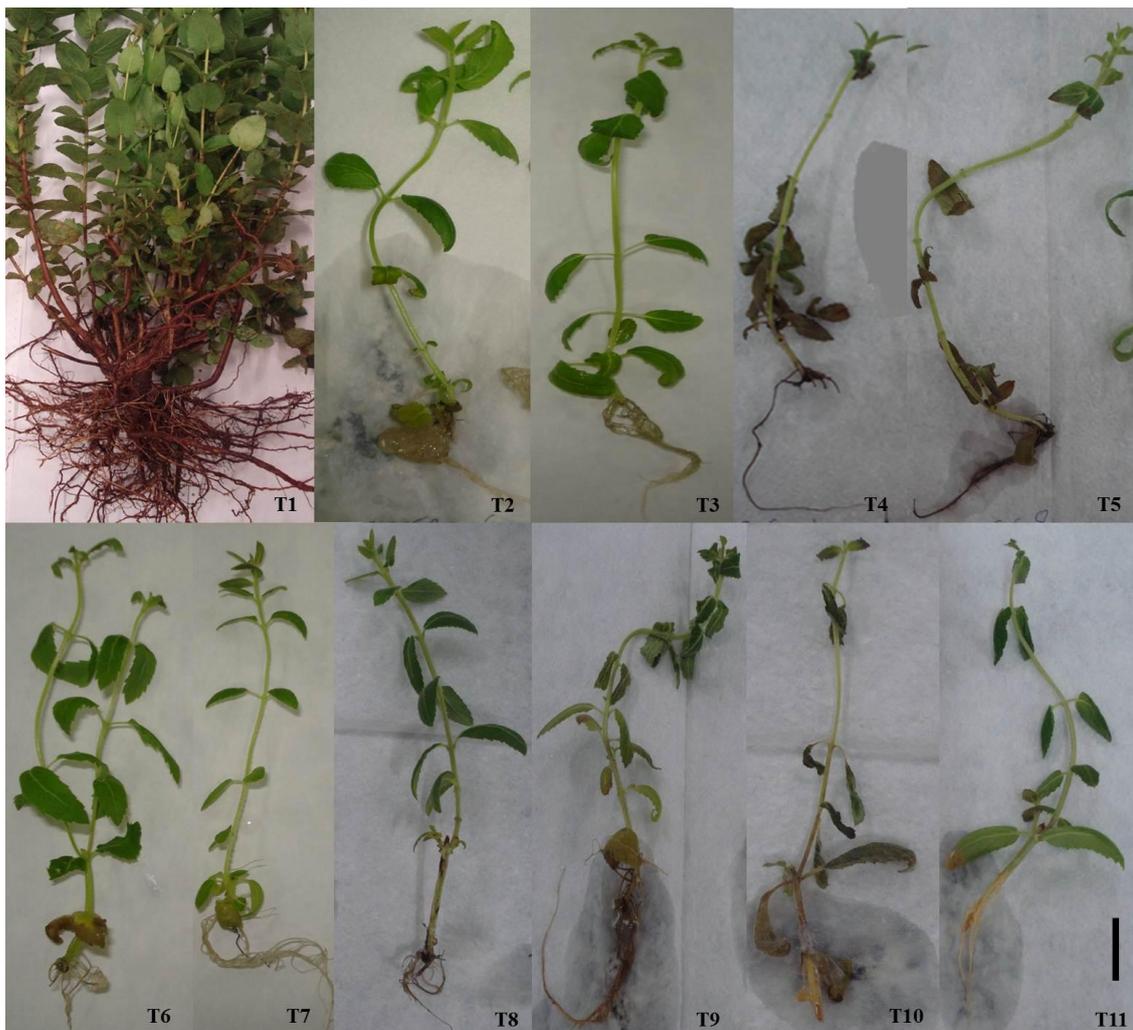


Figura 1. Microplantas de *Hyptis marruboides* Epling utilizadas nos diversos tratamentos, controle e elicitação por bactérias (RF11, RG8, RF10 e RG12) e fungos (RG29, RG31 e RG32) endofíticos obtidos a partir do sistema radicular de uma planta da mesma espécie. Sintomas de murcha e queda foliar (T4 e T5); sintoma de murcha (T9, T10 e T11). Barra: para C1 = 15 cm, outros = 1,5 cm.

A fração acetato de etila do extrato bruto, quando analisada em CLAE-DAD, evidenciou a existência de picos majoritários, aos 20 min e 12 min.

O espectro no UV do composto **1** apresentou bandas de absorção a 204, 258 e 357 nm, típicas de flavonóides. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C apresentam sinais característicos de um núcleo flavonoídico, cujo padrão de acoplamento do anel B sugere um núcleo quercetina. Observam-se ainda neste espectro os sinais referentes a uma unidade monoglicosídica. A estrutura do composto **1** foi proposta com base no conjunto dos dados espectrais de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC, os quais apresentaram boa

concordância com os reportados na literatura para o flavonóide quercetina -7-*O*-glicosídeo (Clae *et al.*, 2002).

O flavonóide quercetina vem sendo estudado como potencial atenuante de processos inflamatórios (Schultke *et al.*, 2010) e também por reduzir o fator de crescimento vascular endotelial em tumores (Luo *et al.*, 2008). Nos resultados de quantificação da quercetina -7-*O*-glicosídeo (Pico 12 min) nas microplantas de *Hyptis maruboides* Epling submetidas à inoculação de isolados endofíticos, bacterianos e fúngicos, em comparação com a planta *ex vitro*, todas as microplantas, elicidadas ou controle, apresentaram valores baixos para esse composto, comparadas à quantidade apresentada pela planta *ex vitro*, que foi de 19,02 mg g⁻¹ de peso seco (Tabela 3). Este trabalho detectou baixas quantidades desse nas plantas de *Hyptis marruboides* Epling provindas o sistema *in vitro*, contudo, outros trabalhos têm mostrado aumento na síntese de flavonóides *in vitro*, com o uso ou não de elicitores. Quercetina -3-*O*-glicosídeo foi identificada como metabólito secundário obtido do extrato etanólico de culturas de *Drosera binata* cultivada *in vitro* (Marczack *et al.*, 2005). Martin & Dusek (2007) ampliaram a síntese de baicalina e baicaleína em suspensões celulares de *Scutellaria baicalensis* Georgii, utilizando como elicitor, cinamato de sódio. Para células dessa mesma planta, o tratamento com metil jasmonato aumentou o índice de flavonas (Xu *et al.*, 2010).

Tabela 3. Quantidades de flavonóide e ácido clorogênico presentes na massa seca das partes aéreas da planta *ex vitro* de *Hyptis marrubioides* Epling, da microplanta e de microplantas submetidas à inoculação de bactérias e fungos elicitores.

	Tratamento	Quercetina -7- O-glicosídeo mg/gPS	Ácido 3,4-O- dicafeoilquínico mg/gPS
Plantas	1	19,02a* ± 0,47**	1,91b ± 0,31
	2	1,26b ± 0,20	32,84b ± 8,08
Elicitação bacteriana	3	1,74b ± 0,44	34,50b ± 7,50
	4	0,92b ± 0,06	16,32b ± 4,56
	5	0,85b ± 0,01	19,13b ± 6,70
	6	0,94b ± 0,03	38,13b ± 2,23
	7	1,27b ± 0,17	29,71b ± 8,16
Elicitação Fúngica	8	1,59b ± 0,36	60,57ab ± 10,8
	9	2,36b ± 1,15	58,54ab ± 8,6
	10	2,19b ± 0,20	16,57b ± 10,5
	11	1,00b ± 0,04	128,74a ± 35,20

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não se diferem pelo teste Tukey (5%),

**Erro padrão da média.

Com relação ao espectro de UV da banda cromatográfica obtida a 20 min (Figura 2 e 3), o composto **2** apresentou três máximos de absorção em 199, 232 e 329 nm. Os dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C , juntamente com o experimento em duas dimensões HMBC evidenciaram a presença de duas unidades cafeoíla, bem como os sinais referentes a molécula do ácido quínico. As posições dos grupos cafeoíla foram determinadas com base nos valores de deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento para os hidrogênios H-3, H-4 e H-5. A comparação dos dados obtidos com os registrados na literatura, permitiu a confirmação a identidade da estrutura de **2** como sendo a do ácido 3,4-O-dicafeoilquínico (Arbiser *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2008).

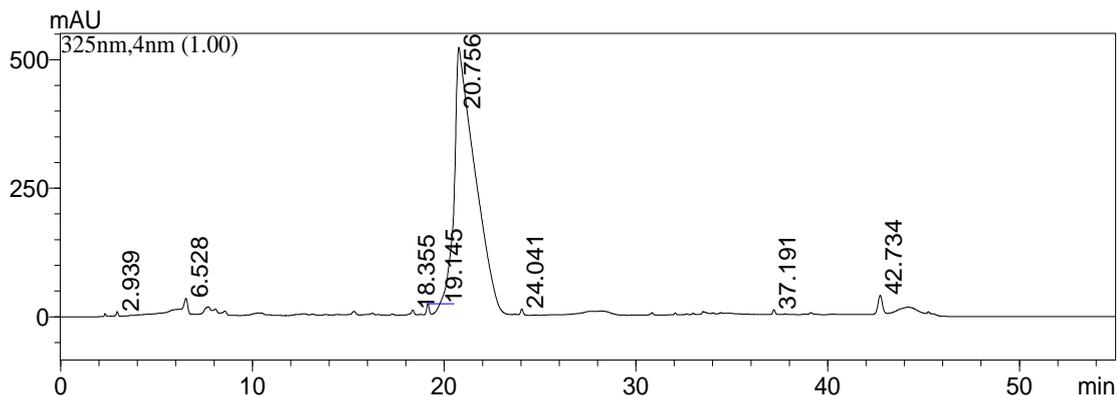


Figura 2. Cromatograma obtido por CLAE a 325 nm a partir do extrato de microplantas de *Hyptis marruboides* Epling submetidas à inoculação do isolado endofítico *Fusarium* sp. (T11), confirmando a presença do Ácido Clorogênico (Pico 20 min) como pico majoritário.

O ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico (Figura 4) é um ácido clorogênico com potencial anti-inflamatório e antioxidante (Barros *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2010). Estudos mostram que o ácido clorogênico pode ser utilizado também, na prevenção do câncer e doenças cardiovasculares (Laranjinha *et al.*, 1994; Sawa *et al.*, 1999), bem como do diabetes e da obesidade (Narita & Inouye, 2009), tendo sido investigado como bioativo para o tratamento de infecções fúngicas. Sung & Lee (2010) em estudos realizados com *Candida albicans*, sugeriram que esse ácido pode exercer atividade antifúngica por perturbar a estrutura da membrana celular. Os resultados de quantificação do ácido clorogênico neste trabalho, mostraram que T11, ou seja, a utilização de *Fusarium* sp. como elicitador, dobrou a quantidade produzida desse ácido (128,74 mg/gPS), se comparada ao controle para os tratamentos com fungos (T8) (60,57 mg/gPS) (Tabela 3 e Figura 2).

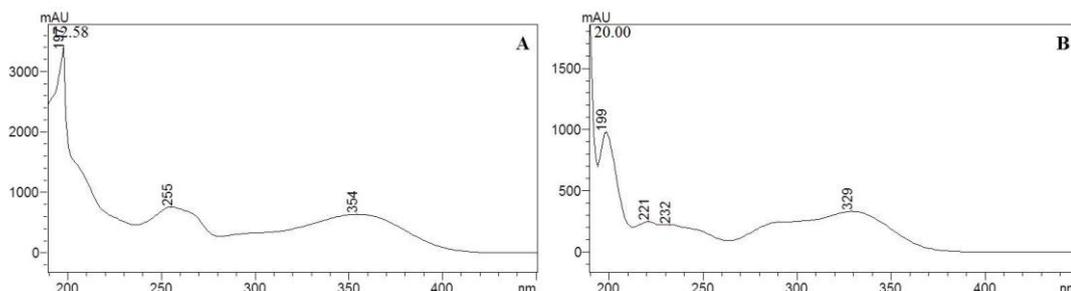


Figura 3. Espectros no UV obtidos dos picos 12 min (A) e 20 min (B) presentes no extrato de microplantas de *Hyptis marruboides* Epling

submetidas à inoculação dos fungos endofíticos *Trichoderma* sp. (A) e *Fusarium* sp. (B), representando o padrão de absorção no UV típico de flavonóides e do Ácido Clorogênico, respectivamente.

A produção desse ácido, pelas microplantas elicidadas, pode ser considerada uma resposta de defesa ao comportamento patogênico que esse endofítico assumiu no sistema *in vitro*, já que o ácido clorogênico tem sido descrito como um composto relacionado à resistência vegetal ao ataque de pragas como lagartas, besouros, cigarrinhas e pulgões, bem como de fungos e bactérias (Leiss *et al.*, 2011). De acordo com Nicholson & Hammerschmidt (1992), fenóis antibióticos podem ser formados em resposta ao ingresso de patógenos e ser parte dos mecanismos de resposta ativa ou, por outro lado, ocorrer constitutivamente nas plantas e funcionar como inibidores pré-formados associados à resistência de plantas não hospedeiras (defesa constitutiva ou pré-formada). Baptista *et al.*, (1999) inocularam plantas de *Eucalyptus urophylla*, ***in vitro*, com duas espécies ectomicorrízicas isoladas de *Pisolithus tinctorius* e, em 96 horas após a inoculação**, verificaram que as raízes inoculadas com os isolados apresentaram um maior significativamente de ácido clorogênico em relação à testemunha.

Quanto aos resultados de CG/EM, de forma generalizada, nos 10 tratamentos avaliados, foi possível detectar a presença das seguintes classes de compostos: hidrocarboneto (alcano, alceno, dieno e alcino), aldeído, amida, álcool, açúcar, ácido graxo, um derivado do ácido cinâmico e um diterpeno (Tabela 4).

Nos tratamentos T2 e T3, considerados como controle geral e controle para os experimentos associados a bactérias, respectivamente, constatou-se a predominância de ácidos graxos e a presença da acetamida (0,16%). Pollmann *et al.*, (2004), utilizando uma combinação de CLAE/CG-EM/EM, conseguiram isolar um derivado indólico de acetamida de sementes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, submetidas à germinação. O declínio nos níveis de AIA durante a germinação foi acompanhado por uma redução nos níveis de Indol-3-acetamida. A enzima nitrilase, conhecida por sintetizar AIA a partir de indol-3-acetonitrila, tem se destacado por produzir quantidades significativas de Indol-3-acetamida *in vitro*, como um produto final dessa reação.

A inoculação das bactérias RF11, RG8, RF10 e RG12, respectivamente, o constituinte heptametil-hexadeceno se apresentou em maior proporção relativa (63,7%), ocorrendo apenas no tratamento T5. A segunda classe de compostos representativa

nestes quatro tratamentos foi a dos ácidos graxos, sendo o éster metílico do ácido 12-acetilóxi-9-octadecenóico o seu maior representante (28,1%). A presença da lactona diterpênica andrografolídeo (**3**), foi constatada em T4 (26,8%) e T5 (5,62%), (Figura 4). Os interesses sobre a síntese de andrografolídeo têm crescido consideravelmente, visto que essa molécula, ou mesmo seus derivados, têm demonstrado propriedades anticancerígenas (Zhou *et al.*, 2010), antibacterianas (Chen *et al.*, 2011), anti-inflamatórias (Lee *et al.*, 2011) e mesmo anti-HIV (Wang *et al.*, 2011). Quanto à produção do alcino 7-tetradecino, foi observada apenas em T5 (0,87%). Este hidrocarboneto também foi identificado por Bryant & McClung (2011) como componente volátil de *Oryza sativa* (L.) ao analisarem, por CG/EM, os compostos que conferem aroma e sabor ao grão.

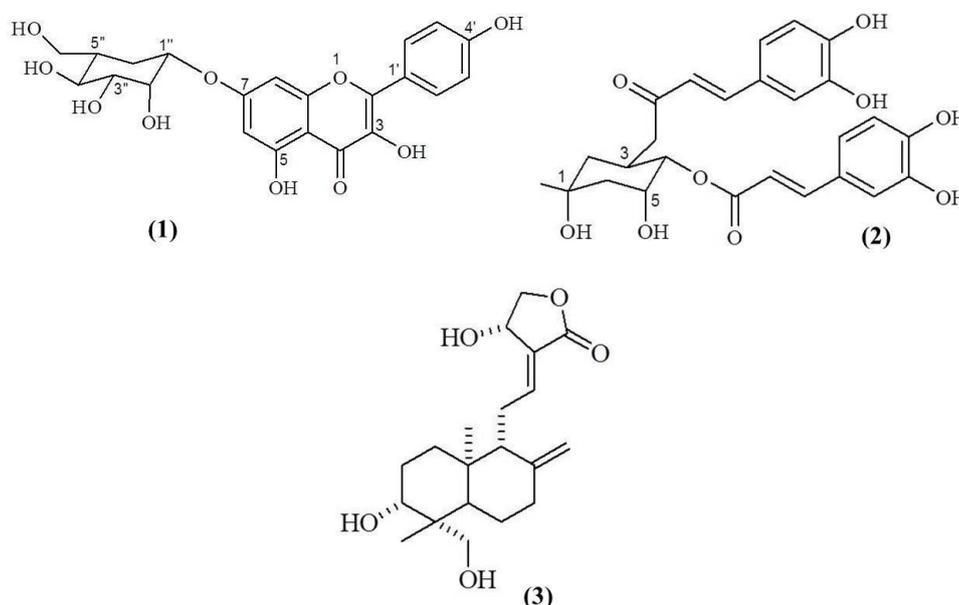


Figura 4. Estruturas químicas dos compostos (1) quercetina -7-O-glicosídeo, (2) ácido 3,4-O-dicafeoilquínico e (3) andrografolídeo.

Considerando os experimentos realizados com os fungos endofíticos T9 a T11 em comparação ao controle T8, o 3,4-dimetóxi-cinamato de metila (15,5%) e o diterpeno andrografolídeo (3,73%) mostram-se presentes apenas em T8. Já o éster metílico do ácido hexadecanóico (7,53%) foi o único representante dos ácidos graxos produzido em T8.

Nos tratamentos T9 a T11, observou-se que a elicitação com fungos possibilitou uma intensificação na biossíntese do 7-tetradecino (10,2%) e permitiu uma

diversificação maior das classes estruturais. Este fato é comprovado pela presença do álcool 4-noneno-1-ol (2,47%), do aldeído 14-heptadecenal (4,42%), do neofitadieno (10,65%) e do cloreto de 9,12-Octadecadienoila (12,5%). Heptadecenal foi um dos aldeídos de cadeia longa, insaturados e com atividade antibiótica, obtidos por Gallo *et al.*, (2004) a partir da cultura do fungo *Cladosporium* sp., obtido de um sedimento marinho. Neste trabalho, ele foi detectado apenas no tratamento em que houve inoculação do fungo FG31. Já o neofitadieno tem sido associado a propriedades antivirais e anti-inflamatórias. Santoyo *et al.*, (2011) isolaram neofitadieno como parte da composição do extrato etanólico da microalga *Dunaliella salina*, sendo que o mesmo extrato mostrou atividade inibitória contra o vírus herpes simplex tipo I. Este composto também foi encontrado como componente do óleo essencial de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist, sendo que o extrato alcoólico dessa planta se mostrou eficiente em conter acessos inflamatórios (Santana *et al.*, 2011).

Outro fato interessante é que, quando se compara a produção de ácidos graxos nos experimentos envolvendo bactérias e fungos, observa-se que em ambos os casos os ácidos graxos predominantes são o ácido hexadecanóico e o ácido 9,12,15-octadecatrienóico, na forma de seus ésteres metílicos. Ribeiro *et al.*, (1998) demonstraram que frações obtidas das folhas de gergelim (*Sesamum indicum* L. - Pedaliaceae), continham uma mistura de ácidos graxos, onde os componentes majoritários eram os ácidos tetradecanóico, hexadecanóico, octadecanóico, icosanóico, docosanóico e 9,12,15 octadecatrienóico. Estas foram capazes de inibir fortemente o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer, sin. de *Rozites gongylophora* Möller, cultivado pela formiga cortadeira *Atta sexdens* L. O cultivo *in vitro*, por ser um sistema altamente estressante (Gaspar *et al.*, 2002), pode ter funcionado como estimulante à síntese de ácidos graxos na forma de seus ésteres metílicos, pelas plantas de *Hyptis marruboides* Epling testadas. No entanto, para a maioria dos fungos e bactérias testados como elicitores, a produção desses ácidos foi maior se comparada aos tratamentos controle, o que pode constituir uma resposta da planta à presença do microrganismo.

Os dados obtidos nos tratamentos realizados sugerem que em relação às bactérias, T5 foi o experimento que proporcionou maior diversificação estrutural e número de metabólitos produzidos, enquanto para as espécies fúngicas, isto correu com o T10 (Figura 5).

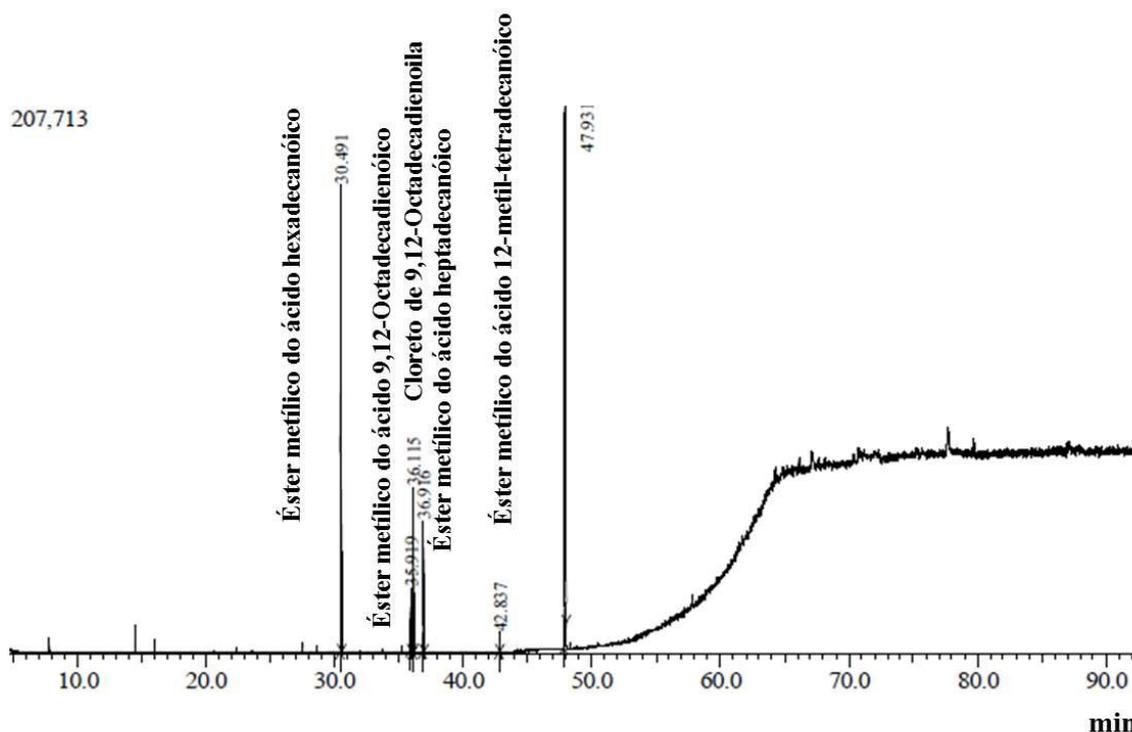


Figura 5. Cromatograma obtido via CG/EM do extrato de microplantas de *Hyptis marruboides* Epling submetidas à inoculação do isolado endofítico RG31 (T10), demonstrando a diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes na amostra.

A técnica da elicitação *in vitro* tem se mostrado uma importante estratégia para a produção de compostos ativos de plantas medicinais. Culturas de raiz de *Angelica gigas* Nakai, elicidadas com uma combinação de extrato de levedura e íons cobre, aumentou a acumulação do decursinol angelato (Rhee *et al.*, 2010). A elicitação *in vitro* por minerais e ácido jasmônico, também foi eficiente em aumentar os índices de alcalóides produzidos pelas raízes de *Datura stramonium* L. (Amdoun *et al.*, 2009). Neste trabalho, alguns metabólitos como neofitadieno foram sintetizados apenas nos tratamentos em que houve elicitação, sugerindo que esse método pode ser mais elaborado, para se obter esse metabólito através de plantas de *Hyptis marruboides* Epling elicidadas *in vitro*. O alceno heptametil-hexadeceno foi produzido apenas nos experimentos com bactérias, contrastando com os metabólitos: 4-noneno-1-ol; 14-heptadecenal, cloreto de 9,12-Octadecadienoila, e 1,1'-Biciclopentil, 2-hexadecil, detectados apenas nos tratamentos com fungos. Isso significa que os isolados endofíticos bacterianos e fúngicos utilizados como elicitores induziram respostas metabólicas diferentes em microplantas de *Hyptis marruboides* Epling. Contudo, outros

Tabela 4. Metabólitos obtidos via CG/EM do extrato de microplantas de *Hyptis marruboides* Epling submetidas ou não à elicitação por isolados endofíticos bacterianos e fúngicos.

Composto	Fórmula	PM	TR	Área (%)										
				T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	
Acetamida	C ₂ H ₃ NO	59	21,09		0,16						0,03	0,27	0,18	
4-Noneno-1-ol	C ₉ H ₁₈ O	142	35,90									2,47		
1,6-Anidro-beta-D-glucofuranose	C ₆ H ₁₀ O ₅	162	30,84			25,7								
Éster metílico do ácido nonanóico	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172	30,49					2,86						
Metil-α-D-ribopiranosídeo	C ₆ H ₁₂ O ₃	164	19,30											3,30
7-Tetradecino	C ₁₄ H ₂₆	194	35,90				0,87				10,15	10,21		
Éster metílico do ácido 8-metil-decanóico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200	36,91								5,95			
3,4-dimetóxi-cinamato de metila	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222	67,65							15,5				
14-Heptadecenal	C ₁₇ H ₃₂ O	252	27,53										4,42	
Éster metílico do ácido 12-metil-tetradecanóico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	36,9		2,32						2,99	1,07		
Éster metílico do ácido 9,12-hexadecadienóico	C ₁₇ H ₃₀ O ₂	266	35,92									9,06		
Éster metílico do ácido hexadecanóico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	30,50	11,0	16,8		4,31	25,0	37,9	7,53	21,6	41,5	15,5	
1-(2-Hidroxietoxi)-2-metil-tetradecano	C ₁₇ H ₃₆ O ₂	272	21,31	0,26										
Neofitadieno	C ₂₀ H ₃₈	278	27,50				1,94							10,6
Ácido 9,12-Octadecadienóico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280	35,92	1,31										
Éster metílico do ácido heptadecanóico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	30,48		2,99		0,88		9,86				8,70	
Éster metílico do ácido 9,12,15-Octadecatrienóico	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	36,13	16,2	17,4		2,50	19,7	37,4		18,3	32,6	22,2	
Éster metílico do ácido 9,12-Octadecadienóico	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	35,93	5,34					14,8				13,8	7,44

Continuação da tabela 4.

Composto	Fórmula	PM	TR	Área (%)										
				T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	
Éster metílico do ácido octadecanóico	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298	36,92											11,9
Éster metílico do ácido 11,14,17-Eicosatrienóico	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	320	36,12	5,05								7,72		
Andrografolídeo	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	350	22,37			26,8	5,62		3,73					
Éster metílico do ácido 12-acetilóxi-9-octadecanóico	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	354	30,49	2,78		28,1								21,8
1,1'-Biciclopentil, 2-hexadecil	C ₂₆ H ₅₀	362	27,50									4,13		
1,2,6A,6B,9,9,12A-Heptametil-1,3,4,5,6,6A,6B,7,8,8A,9,12,12A,12B,13,14B-Hexadeceno	C ₃₁ H ₄₈ O ₂	452	77,70				63,7							

elicitores bióticos, ou mesmo abióticos devem ser testados, visando a obtenção de metabólitos de interesse.

RESUMO

Resposta metabólica induzida por fungos e bactérias endofíticas em microplantas de *Hyptis marruboides* Epling

Os mecanismos elicitores, através da indução de respostas de resistência, podem levar ao acúmulo de metabólitos secundários nos tecidos vegetais, já que estes têm sua síntese estimulada na presença do elicitor. *Hyptis marrubioides* Epling é uma Lamiaceae medicinal, nativa do Cerrado, para a qual não existem dados relacionados à elicitação. Este trabalho avaliou a resposta metabólica de microplantas dessa espécie à inoculação de quatro isolados endofíticos bacterianos e três fúngicos, utilizados como elicitores bióticos, e comparou essa resposta à de plantas de *Hyptis marrubioides* Epling crescidas em condições *ex vitro*. No sistema *in vitro*, duas das bactérias endofíticas testadas e os três fungos se comportaram como patógenos. As bactérias provocaram sintomas de murcha, queda foliar e escurecimento radicular, enquanto os fungos provocaram apenas murcha. Os extratos vegetais das amostras foram avaliados por CLAE-DAD e CG/EM. As análises de CLAE revelaram dois picos majoritários, sendo um correspondente ao flavonóide quercetina -7-*O*-glicosídeo e outro correspondente ao ácido clorogênico, ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico. Foi detectada, nas microplantas, uma baixa concentração do flavonóide, quando comparadas à planta *ex vitro* e o tratamento com o fungo *Fusarium* sp. foi o mais eficiente em estimular a biossíntese do ácido clorogênico. As análises com CG/EM mostraram no geral, uma alta diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos, sendo que alguns metabólitos, tal como 7-Tetradecino e neofitadieno só apareceram nos tratamentos em que houve elicitação. Além disso, o metabólito heptametil-hexadeceno foi biossintetizado especificamente em tratamento com bactéria em contraste com 4-noneno-1-ol; 14-Heptadecenal, cloreto de 9,12-Octadecadienoila, e 1,1'-Biciclopentil, 2-hexadecil, detectados apenas nos tratamentos com fungos.

Palavras-chave: elicitação, cultivo *in vitro*, metabólitos secundários.

REFERÊNCIAS

1. Alwis, R. De.; Fujita, K.; Ashitani, T.; Kuroda, K. (2009). Induced monoterpene and lignin production in mechanically stressed and fungal elicited cultured *Cupressus lusitanica* cells. *Plant Biotechnol. Rep.*, 3, 57–65.
2. Almeida, C.V.; Yara, R.; Almeida, M. (2005). Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. *Pesq. Agropec. Bras.*, 40 (5), 467-470.

3. Alves, E. (2007). Mecanismos estruturais na resistência de plantas a patógenos. *Summa Phytopathol.*, 33, 154-156.
4. Amdoun, R.; Khelifi, L.; Khelifi-Slaoui, M.; Amroune, S.; Benyoussef, E-H.; Thi, D.V.; Assaf-Ducrocq, C.; Gontier, E. (2009). Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: Modelization of the *in vitro* biochemical response. *Plant Science*, 177 (2), 81-87.
5. Arbiser, J.L.; Li, X.C.; Hossain, C.F.; Nagle, D.G.; Smith, D.M.; Miller, P.; Govindaraian, B.; DiCarlo, J.; Landis-Piwowar, K.R.; Dou, Q.P. (2005). Naturally Occurring Proteasome Inhibitors from Mate Tea (*Ilex paraguayensis*) Serve as Models for Topical Proteasome Inhibitors. *J. Invest. Dermatol.*, 125, (2), 207-212.
6. Arrigoni-Blank, M.F.; Antonioli, A.R.; Caetano, L.C.; Campos, D.A.; Blank, A.F.; Alves, P.B. (2008). Antinociceptive activity of volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. *Phytomedicine*, 15, 334-339.
7. Azevedo, J.L. (1998). Microrganismos endofíticos. *In: Ecologia Microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA*, 117-137.
8. Baptista, M.; Gloria, B.A.; Pascholati, S.F.; Krugner, T.L. (1999). Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla in vitro*. *Rev. Bras. Bot.*, 22 (2), 309-315.
9. Barbosa, A. da S.; Medeiros, M. B. de. (2007). Potencial de ação elicitora dos biofertilizantes líquidos na indução de resistência sistêmica vegetal. *Rev. Bras. Agroecologia*, 2 (2), 1453-1457.
10. Barros, F.C.; Sagata, É.; Ferreira, L.C.C.; Juliatti, F.C. (2010). Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. *Biosci. J.*, 26 (2), 231-239.
11. Barros, M.P.; Santin, S.M.O.; Costa, W.F.; Vidotti, G.J.; Sarragiotto, M.H. (2008). Constituintes químicos e avaliação do potencial antiinflamatório e antioxidante de extratos das folhas de *Chomelia obtusa* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae). *Quim. Nova*, 31 (8), 1987-1989.
12. Bryant, R.J.; McClung, A.M. (2011). Volatile profiles of aromatic and non-aromatic rice cultivars using SPME/GC-MS. *Food Chem.*, 124, 501-513.
13. Chen, Z-G.; Zhu, Q.; Zong, M-H.; Gu, Z-X; Han, Y-B. (2011). Enzymatic synthesis and antibacterial activity of andrographolide derivatives. *Process Biochem.*, 46 (8), 1649-1653.

14. Choudhary, D.K.; Prakash, A.; Johri, B.N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J. Microbiol.*, 47, 289-297.
15. Chong, T.M.; Abdullah, M.A.; Lai, O.M.; Nor'Aini, F.M.; Lajis, N.H. (2005). Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. *Process Biochem.*, 40, 3397-3405.
16. Clae, S.W.; Lee, S.; Kang, S.S.; Lee, H.J. (2002). Flavone Glucosides from the leaves of *Helianthus tuberosus*. *Natural Products Sciences*, 8 (4), 141-143.
17. Coqueiro, D.S.O.; Silva, C.N.; Cerqueira-Silva, C.B.M.; Lima, G.S.A.; Santos, A.; Oliveira, A.C. (2011). Aplicação de suspensões de *Agaricus blazei*, *Lentinula edodes* e de acibenzolar-S-metil na redução da antracnose em frutos de maracujá-azedo. *Trop. Plant Pathol.*, 36 (1), 54-59.
18. Costa, M.D.; Lovato, P.E.; Sete, P.B. (2010). Micorrização e indução de quitinases e β -1,3-glucanases e resistência à fusariose em porta-enxerto de videira. *Pesq. Agropec. Bras.*, 45 (4), 376-383.
19. Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.M.; Lima, E.O.; Siqueira-Junior, J.P. (2009). *In vitro* phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 96, 63-65.
20. Errasti, A., Carmáran, C.C.; Victoria Novas, M. (2010). Diversity and significance of fungal endophytes from living stems of naturalized trees from Argentina. *Fungal Diversity*, 41 (1), 29-40.
21. Ferreira, D.F. (2003). *Sisvar*: versão 4.2. Lavras: UFLA.
22. Gallo, M.B.C.; Cavalcanti, B.C.; Barros, F.W.A.; Moraes, M.O.; Costa-Lotufo, L.V.; Pessoa, C.; Bastos, J.K.; Pupo, M.T. (2010). Chemical Constituents of *Papulaspora immersa*, an Endophyte from *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae), and Their Cytotoxic Activity. *Chem. Biodiver.*, 7, 2941-2950.
23. Gallo, M.; Seldes, A.M.; Cabrera, G.M. (2004). Antibiotic long-chain and a,b-unsaturated aldehydes from the culture of the marine fungus *Cladosporium* sp. *Biochem. System. Ecol.*, 32, 545-551.
24. Gaspar, T.; Franck, T.; Bisbis, B.; Kevers, C.; Jouve, L.; Hausman, J.F.; Dommès, J. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 37 (3), 263-285.
25. Guzzo, S.D.; Bach, E.E.; Martins, E.M.F.; Moraes, W.B.C. (1993). Crude exopolysaccharides (EPS) from *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and commercial xanthan gum as inducers

- of protection in coffee plants against *Hemileia vastatrix*. *J. Phytopathol.*, 139, 119-128.
26. Han, J.; Ye, M.; Qiao, X.; Xu, M.; Wang, B-R.; Guo, D-A. (2008). Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 47 (3), 516-525.
 27. Hwang, J.-S.; You, Y.-H.; Bae, J.-J.; Khan, S.A.; Kim, J.-G., and Choo, Y.-S. (2011). Effects of endophytic fungal secondary metabolites on the growth and physiological response of *Carex kobomugi* Ohwi. *J. Coast. Res.*, 27 (3), 544–548.
 28. Johansen, D. A. (1940). *Plant Microtechnique*. New York: Mc Graw Hill Book Co.
 29. Lanna Filho, R.; Ferro, H.M.; Pinho, R.S.C. (2010). Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Ver. Trópica Ciên. Agrár. Biol.*, 4 (2), 12-20.
 30. Laranjinha, J.A.; Almeida, L.M.; Madeira, V.M. (1994). Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 48, 487-494.
 31. Lee, K-C.; Chang, H-H., Chung, Y-H.; Lee, T-Y. (2011). Andrographolide acts as an anti-inflammatory agent in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages by inhibiting STAT3-mediated suppression of the NF- κ B pathway. *J. Ethnopharmacol.*, 135 (3), 678-684.
 32. Leiss, K.A.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R.; Klinkhamer, P.G.L. (2011). An overview of NMR-based metabolomics to identify secondary plant compounds involved in host plant resistance. *Phytochem. Rev.*, 10, 205-216.
 33. Lima, F.A.; Santana, A.E.G.; Ataíde, T.R.; Omena, C.M.B.; Menezes, M.E.S.; Vasconcelos, S.M.L. (2010). Café e saúde humana: um enfoque nas substâncias presentes na bebida relacionadas às doenças Cardiovasculares. *Rev. Nutr.*, 23 (6), 1063-1073.
 34. Luo H, Jiang BH, King SM *et al.* (2008) Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. *Nutr. Cancer*, 60 (6), 800-809.
 35. Marczak, L.; Kawiak, A.; Lojkowska, E.; Stobieck, M. (2005). Secondary Metabolites in *in vitro* Cultured Plants of the Genus *Drosera*. *Phytochem. Anal.*, 16, 143-149.

36. Martin, J.; Dusek, J. (2007). Flavonoid accumulation in *Scutellaria baicalensis* Georgii in vitro cultures upon treatment with sodium cinnamate. *Ceska Slov Farm.*, 56 (6), 280-283.
37. Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 473.
38. Naoumkina, M.A.; He, X.; Dixon, R.A. (2008). Elicitor-induced transcription factors for metabolic reprogramming of secondary metabolism in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*, 8 (132), 1-14.
39. Narita, Y.; Inouye, K. (2009). Kinetic analysis and mechanism on the inhibition of chlorogenic acid and its components against porcine pancreas alpha-amylase isozymes I and II. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 9218-9225.
40. Nery-Silva, F.A.; Fernandes, J.J.; Juliatti, F.C.; Melo, B. (2007). Reação de germoplasma de mandioca a *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihots*. *Semina: Ciênc. Agra.*, 28 (1), 3-10.
41. Nicholson, R.L.; Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30, 369-89.
42. Oliveira, M.C.; Simões, K.; Braga, M.R. (2009). Substâncias antifúngicas constitutivas e induzidas em folhas e suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae). *Revista Brasil. Bot.*, 32 (3), 509-519.
43. Osbourn, A. (2010). Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet.*, 26 (10), 449-457.
44. Ownley, B.H.; Gwinn, K.D.; Veeega, F.E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl.*, 55 (1), 113-128.
45. Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Shah, J., Tsui, F.; Klessig, D.F. (1997). Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai 1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA – induce expression of the tms2 gene. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 10, 69-78.
46. Pinto, Z.; Bettiol, W.; Morandi, M.A.B. (2010). Efeito de casca de camarão, hidrolisado de peixe e quitosana no controle da murcha de *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* em crisântemo. *Trop. Plant Pathol.*, 35 (1), 16-23.
47. Pitta-Alvares, S.I.; Spollansky, T.C.; Giulietti, A.M. (2000). The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane

- alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia cândida*. *Enzym. Microb. Tech.*, 26, 252–258.
48. Pollmann, S.; Muller, A.; Piotrowski, M. Weiler, E.W. (2004). Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 216 (1), 155-161.
 49. Ramos, H.P.; Braun, G.H.; Pupo, M.T.; Said, S. (2010). Antimicrobial activity from endophytic fungi *Arthrimum* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immerse*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53 (3), 629-632.
 50. Rhee, H.S.; Cho, H-Y.; Son, S-Y.; Yoon, S-H.H.; Park, J.M. (2010). Enhanced accumulation of decursin and decursinol angelate in root cultures and intact roots of *Angelica gigas* Nakai following elicitation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 101 (3), 295-302.
 51. Ribeiro, S.B.; Pagnocca, F.C.; Victor, S.R.; Bueno, O.C.; Hebling, M.J.; Bacci Jr., M.; Silva, O.A.; Fernandes, J.B.; Vieira, P.C.; Silva, M.F.G.F. (1998). Activity of Sesame Leaf Extracts Against the Symbiotic Fungus of *Atta sexdens* L. *An. Soc. Entomol. Brasil.*, 27 (3), 421-426.
 52. Rodrigues, V.E.G.; Carvalho, D.A. (2001). Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciênc. Agrotec.*, 25 (1), 102-123.
 53. Roldão, G.M.; Pfenning, L.H. (2001). Caracterização e identificação de fungos endofíticos em grãos verdes de café (*Coffea arabica* L.). In: II Simpósio de pesquisas dos cafés do Brasil. Brasília, D.F. : Embrapa Café, 1057-1062.
 54. Sales, J. F.; Pinto, J. E. B. P.; Botrel, P. P.; Oliveira, C. B. A.; Ferri, P. H.; Paula, J. R.; Seraphin, J. C. (2007). Composition and chemical variability in the essential oil of *Hyptis marrubioides* Epl. *J. Essential Oils Res.*, 19 (6), 552-556.
 55. Santana, P.M.; Miranda, M.; Gutiérrez, Y.; García, G.; Orellana, T.; Orellana-Manzano, A. (2011). Efecto antiinflamatorio y antimicótico del extracto alcohólico y composición química del aceite de hojas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (canilla de venado). *Rev. Cubana Plant. Med.*, 16 (1), 13-23.
 56. Santoyo, S.; Jaime, L.; Plaza, M.; Herrero, M.; Rodriguez-Meizoso, I.; Ibãñez, E.; Reglero, G. (2011). Antiviral compounds obtained from microalgae commonly used as carotenoid sources. *J. Appl. Phycol.*, 23 (3), DOI: 10.1007/s10811-011-9692-1.

57. Sawa, T.; Nakao, M.; Akaike, T.; Ono, K.; Maeda, H. (1999). Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *J. Agric. Food Chem.*; 47, 397-402.
58. Schultke, E.; Griebel, R.W.; Juurlink, B.H.J. (2010). Quercetin attenuates inflammatory processes after spinal cord injury in an animal model. *Spinal Cord.*, 48, 857-861.
59. Sharma, M.; Sharma, A.; Kumar, A.; Basu, S.K. (2011). Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cells through stress stimulus. *Am. J. Plant Physiol.*, 6, 50-71.
60. Srivastava, S.; Srivastava, A.K. (2007). Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 27 (1), 29-43.
61. Sung, W.S.; Lee, D.G. (2010). Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure Appl. Chem.*, 82 (1), 219-226.
62. Teixeira, D.A.; Alfenas, A.C.; Mafia, R.G.; Mafia, L.A.; Ferreira, E.M. (2005). Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. *Fitopatol. Bras.*, 30 (4), 350-356.
63. Wang, B.; Li, J.; Huang, W.L.; Zhang, H.B.; Qian, H.; Zheng, Y.T. (2011). Synthesis and biological evaluation of andrographolide derivatives as potent anti-HIV agents. *Chin. Chem. Lett.*, 22 (7), 781-784.
64. Xu, H.; Park, N.L.; Li, X.; Kim, Y.K.; Lee, S.Y.; Park, S.U. (2010). Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase and genes involved in flavone biosynthesis in *Scutellaria baicalensis*. *Bioresource Technology*, 101 (24), 9715-9722.
65. Zhi-lin, Y.; Chuan-chao, D.; Lian-qing, C. (2007). Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. *Afr. J. Biotechnol.*, 6 (11), 1266-1271.
66. Zhou, J.; Ong, C-N.; Hur, G-M.; Shen, H-M. (2010). Inhibition of the JAK-STAT3 pathway by andrographolide enhances chemosensitivity of cancer cells to doxorubicin. *Biochem. Pharmacol.*, 79, 1242-1250.

67. Zoccoli, D.M.; Tomita, C.K.; Uesugi, C.H. (2009). Ocorrência de murcha bacteriana em helicônias e musácea ornamental no Distrito Federal. *Trop. Plant Pathol.*, 34 (1), 45-046.

CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho identificou a presença de FMAs e DSEs em fragmentos de raízes de *Hyptis marruboides* Epling, além de isolar 42 bactérias endofíticas, das quais 27 foram de fragmentos de raiz grossa e 15 de fragmentos de raiz fina. Foram isolados também nove linhagens de fungos endofíticos, seis de raiz grossa e três de raiz fina. Bactérias gram positivas e catalase positivas representaram a maioria dos isolados bacterianos, predominando a forma de bacilo. Do total de isolados fúngicos, a maioria apresentou micélio esporulante e foi constatada a ocorrência dos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Papulaspora*. Esses isolados endofíticos foram avaliados quanto à sua capacidade de solubilizar fosfatos de Ca e de Fe em meio de cultura sólido, bem como de sintetizar AIA *in vitro*, sendo que pouco mais de 20% solubilizou CaHPO_4 . Contrariamente, 59% dos microrganismos testados solubilizaram FePO_4 . Das linhagens bacterianas testadas para a biossíntese de AIA, 50% demonstraram capacidade de produzir essa auxina. Do ponto de vista biotecnológico, destacaram-se as linhagens RG9, RG24 e RF18, com indicação de alto potencial de solubilização de FePO_4 e produção AIA. Os testes de elicitação de microplantas de *Hyptis marruboides* Epl. com quatro isolados endofíticos bacterianos e três fúngicos, em comparação com plantas cultivadas *ex vitro* revelaram duas bandas cromatográficas majoritárias, sendo uma correspondente ao flavonóide quercetina -7-*O*-glicosídeo e outra correspondente ao ácido clorogênico, ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico. Nas microplantas, foi detectada uma baixa concentração do flavonóide, quando comparadas à planta *ex vitro*. O tratamento com o fungo *Fusarium* sp. foi o mais eficiente em estimular a biossíntese de ácido clorogênico. Os extratos vegetais mostraram uma alta diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos, sendo que alguns metabólitos, tal como 7-Tetradecino e neofitadieno só apareceram em tratamentos em que houve elicitação. Além disso, o metabólito

heptametil-hexadeceno foi biossintetizado, especificamente, em tratamento com bactéria em contraste com 4-noneno-1-ol; 14-Heptadecenal, cloreto de 9,12-Octadecadienoila, e 1,1'-Biciclopentil, 2-hexadecil, detectados apenas nos tratamentos com fungos.