

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Efeito da elicitação biótica com o fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson no metabolismo secundário de plantas aclimatadas de *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt

GABRIELA DE CARVALHO MEIRELLES

PORTO ALEGRE, 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Efeito da elicitação biótica com o fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson no metabolismo secundário de plantas aclimatadas de *Hypericum polyanthemum* Klotzsech ex Reichardt

Dissertação apresentada por **Gabriela de Carvalho Meirelles** para a obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser

Co-Orientador: Profa. Dra. Sandra Beatriz Rech

Porto Alegre, 2012

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível de Mestrado - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 16.01.2012, aprovada pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Miriam Anders Apel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

de Carvalho Meirelles, Gabriela
Efeito da elicitação biótica com o fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson no metabolismo secundário de plantas aclimatadas de *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt / Gabriela de Carvalho Meirelles. -- 2012.
107 f.

Orientadora: Gilsane Lino von Poser.
Coorientadora: Sandra Beatriz Rech.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Metabolismo secundário. 2. *Hypericum polyanthemum*. 3. Elicitação biótica. 4. *Nomuraea rileyi*. I. Lino von Poser, Gilsane, orient. II. Rech, Sandra Beatriz, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, ambos do Departamento de Produção de Matéria-Prima da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com financiamento da CAPES e do CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

A natureza é o único livro que oferece um conteúdo valioso
em todas as suas folhas.

Johann Wolfgang von Goethe

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as oportunidades que recebi até hoje.

A CAPES pela bolsa de estudos e à Faculdade de Farmácia UFRGS que me proporcionou Graduação e Pós-Graduação em excelência.

À Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser, a Gil, pelos 5 anos de convivência, amizade, compreensão, oportunidades e acima de tudo aprendizado.

À Profa. Dra. Sandra Beatriz Rech por me transmitir todo conhecimento necessário para a realização deste trabalho.

Às colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Jéssica e Amanda por toda ajuda e ensinamentos.

Ao pessoal do Laboratório de Farmacognosia por todos os momentos em que passamos juntos. Ao Maikon por todo o auxílio na etapa crucial do meu trabalho.

Aos colegas e amigos Flávia, Ismael, Paula, Satchie e Sita por deixarem o dia a dia mais divertido e leve.

Às minhas grandes amigas Liliana, Regina, Giovana, Érica, Daniela, Denise e Ana por todos os momentos que me proporcionaram e pela amizade sempre.

A todos os amigos que fiz durante essa caminhada. Principalmente às amigas Raquel e Bruna pelas conversas, desabafos, risadas, choros, festas, vocês são muito importantes para mim.

Gostaria de agradecer em especial a minha avó, a Dodô, por todo o carinho, paciência, incentivo e pela moradia.

Por fim, agradeço aos meus pais, Cláudia e Luiz Felipe, pelo amor, compreensão pelas ausências e incentivo. Às minhas irmãs Renata, pelo constante incentivo, e Luiza, pelo alto astral, companheirismo, risadas e amizade.

RESUMO

Hypericum polyanthemum é uma planta nativa do Sul do Brasil que contém compostos como flavonóides, taninos, derivados de floroglucinol (uliginosina B) e benzopiranos: HP1 (6-isobutiril-5,7-dimetóxi-2,2-dimetilbenzopirano), HP2 (7-hidróxi-6-isobutiril-5-metóxi-2,2-dimetilbenzopirano), e HP3 (5-hidróxi-6-isobutiril-7-metóxi-2,2-dimetilbenzopirano). Esses metabólitos são responsáveis por uma série de atividades biológicas como inibidores da monoaminoxidase (IMAO), antiproliferativa e antitumoral. No presente trabalho modificações na biomassa vegetal e no teor de metabólitos bioativos de plantas de *H. polyanthemum* cultivadas sob condições controladas e após 18 semanas de aclimação foram investigadas após elicitação com o fungo *Nomuraea rileyi* através da adição do microrganismo liofilizado e pulverizado (LP), ou liofilizado, autoclavado e pulverizado (LAP) por curtos e longos períodos de tempo. Plantas cultivadas sob condições controladas tratadas com LAP demonstraram aumento na concentração dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3 enquanto LP provocou efeito negativo ou ainda, não alterou a síntese destes compostos. Porém, baixos níveis do floroglucinol uliginosina B foram detectados em todos os tratamentos. Tratamentos com LAP por longos períodos de tempo em plantas cultivadas a campo provocaram aumento de biomassa (2x) e a análise química demonstrou elevação do teor de compostos fenólicos totais nas partes vegetativas das plantas submetidas a todos os tratamentos. Ainda, a análise apontou um diferente grau de acúmulo dos metabólitos, com maiores teores de HP1, HP2, HP3 e uliginosina B sendo encontrados nas partes reprodutivas das plantas tratadas com LAP. A elevação dos metabólitos bioativos em resposta ao elicitor fúngico sugere que estes compostos são induzíveis na resposta de defesa de *H. polyanthemum*. Os resultados obtidos nesse trabalho são relevantes em virtude da planta não sofrer danos. Assim, o sistema descrito representa uma nova abordagem em pesquisas com plantas visando otimizar condições para a produção de biomassa e metabólitos secundários de interesse medicinal.

Palavras chave: *Hypericum polyanthemum*, elicitação biótica, fungos, *Nomuraea rileyi*

ABSTRACT

Effect of biotic stress in secondary metabolism of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt

Hypericum polyanthemum is a native plant of South Brazil that contains compounds such as flavonoids, tannins, phloroglucinol derivatives (uliginosin B) and benzopyrans: HP1 (6-isobutyryl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethylbenzopyran), HP2 (7-hydroxy-6-isobutyryl-5-methoxy-2,2-dimethylbenzopyran), and HP3 (5-hydroxy-6-isobutyryl-7-methoxy-2,2-dimethylbenzopyran). These metabolites are responsible for biological activities such as monoamine oxidase inhibitor, antiproliferative and antitumoral. In this work changes in biomass and bioactive metabolites after elicitation with the fungi *Nomuraea rileyi* added as freeze dried culture (DC) or as freeze dried autoclaved cell powder (DACP) for short and long periods of time have been investigated in *Hypericum polyanthemum* plants grown under controlled conditions and after 18 weeks of field acclimatization. Plants treated with DACP showed increased concentrations of the benzopyrans while the DC affected negatively or did not alter the synthesis of these compounds. Nevertheless, low levels of uliginosin B were detected in all treatments. Long time treatment of field grown acclimatized plants with DACP triggered plant growth doubling the biomass and chemical analyses demonstrated increased total phenolic compounds yields in the vegetative parts of plants submitted to the treatments. Furthermore, the analysis showed different pattern of metabolites accumulation, with higher yields of benzopyrans and uliginosin B accumulated in the reproductive parts of the plants treated with DACP during all experiment. The elevation of bioactive metabolites levels in response to the elicitor suggests that these compounds are inducible in plant defense response of *H. polyanthemum*. The results obtained are relevant since the plant did not suffer injury. Then, the system described represents a new approach in plant research aimed to optimize the conditions for biomass and accumulation of secondary metabolites.

Keywords: *Hypericum polyanthemum*, biotic elicitation, fungus, *Nomuraea rileyi*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Família Guttiferae (Clusiaceae).....	03
1.2 Gênero <i>Hypericum</i>	03
1.2.1 Taxonomia.....	03
1.2.2 Espécies nativas do sul do Brasil.....	04
1.2.2.1 Flavonóides.....	04
1.2.2.2 Ácidos fenólicos.....	06
1.2.2.3 Xantonas.....	07
1.2.2.4 Derivados de floroglucinol.....	07
1.2.2.5 Óleos voláteis.....	09
1.2.2.6 Benzopiranos.....	09
1.2.3 <i>Hypericum polyanthemum</i>	10
1.3 Cultivo <i>in vitro</i>	11
1.4 Aclimação (cultivo <i>ex vitro</i>).....	14
1.5 Cultivo a campo.....	15
1.6 Estresse biótico.....	16
1.7 Fungos entomopatogênicos.....	19
2. OBJETIVOS	25
3. MANUSCRITO	29
4. DISCUSSÃO GERAL	59
5. CONCLUSÕES	69
6. REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

A área de produtos naturais tem sido explorada há séculos. Os primeiros indícios da utilização de plantas com fins terapêuticos datam de 2600 a.C.: óleo de *Cedrus* sp., e *Cupressus sempervirens*, *Glycyrrhiza glabra*, *Commiphora* sp. e *Papaver somniferum*, sendo alguns destes ainda utilizados no tratamento de gripes, resfriados e doenças microbianas (GURIB-FAKIM, 2006). Porém, ainda há poucos estudos científicos que demonstrem o potencial dos produtos vegetais em tornarem-se produtos com fins terapêuticos. Apenas uma mínima parcela das espécies vegetais estimadas mundialmente foi explorada quanto sua constituição química e atividades biológicas (HAMBURGUER e HOSTETTMANN, 1991; VERPOORTE, 1998; BALUNAS e KINGHORN, 2005; JONE *et al.*, 2006).

Guttiferae é uma extensa família botânica, possuindo cerca de 1000 espécies que apresentam vários constituintes químicos com atividades biológicas diferenciadas (FULLER *et al.*, 1999a, 1999b; VEROTTA *et al.*, 1999). Seus representantes são encontrados em regiões tropicais úmidas, exceto os pertencentes ao gênero *Hypericum* que ocorrem em regiões temperadas (BENNETT e LEE, 1989).

Evidências científicas apontam para resultados biológicos relevantes envolvendo extratos e substâncias isoladas de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul. Entretanto, as espécies brasileiras do gênero apresentam uma distribuição restrita com pequenas populações dispersas, ou ainda, restritas a uma localidade (ROBSON, 1990). Assim, o uso de plantas nativas sem controle eficaz entre exploração e preservação pode levar à extinção das mesmas.

Portanto, o cultivo utilizando tecnologia *in vitro* pode fornecer biomassa para estudos fitoquímicos e farmacológicos, assim como aporte contínuo de material botânico,

representando uma opção à preservação *in natura* dessas plantas (ROUT *et al.*, 2000; MURCH e SAXENA, 2006). Porém, a utilização desta tecnologia pode levar à alteração na taxa de crescimento das plantas, tempo de maturação, tamanhos de partes aéreas e raízes e conteúdo de metabólitos secundários (POUTARAUD e GIRARDIN, 2005). Além disso, a taxa de mortalidade após o cultivo *in vitro* é bastante proeminente (CHANDRA *et al.*, 2010). Deste modo, são necessárias algumas estratégias para possibilitar a sobrevivência das plantas tais como:

- ✓ Deixar a sombra por 3-6 dias para a adaptação ao novo ambiente, favorecendo o alongamento (CHANDRA *et al.*, 2010);
- ✓ As plantas devem ser transferidas vagarosamente para um ambiente de baixa umidade, pois quando retiradas da condição *in vitro*, a transpiração estomatal e cuticular é alta. Para tanto, os vegetais devem ser mantidos sob condições de escuro, e após uma semana, transferidos para potes contendo mistura vermiculita:terra cobertos por filmes plásticos (CHANDRA *et al.*, 2010);
- ✓ Estudos demonstram que a quantidade de carboidrato influencia o processo de aclimação, pois qualquer fator que aumente a taxa fotossintética em condições autotróficas facilitara o estabelecimento do vegetal em um sistema aclimatizado (WAINRIGHT e SCRACE, 1989).

Dessa forma, a associação de microrganismos endófitos, que vivem em simbiose com plantas sem provocar danos, tem sido descrita como alternativa visando aumentar a taxa de crescimento de vegetais (GROPPE *et al.*, 1999) e promover a maior produção de seus metabólitos de defesa (HAO *et al.*, 2010).

Hypericum polyanthemum (Guttiferae), uma planta bianual nativa do Sul do Brasil, contém compostos como xantonas (HAAS, 2010a), flavonóides (DALL' AGNOL *et al.*, 2003; NÖR *et al.*, 2008), taninos (DALL' AGNOL *et al.*, 2003), derivados de

floroglucinol (NÖR *et al.*, 2004) e benzopiranos (FERRAZ *et al.*, 2001) responsáveis por muitas de suas atividades farmacológicas. Entretanto, sendo esta uma planta de distribuição restrita, este estudo está direcionado ao cultivo *in vitro*, *ex vitro* e otimização da produção de seus metabólitos através da associação com o fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson.

1.1 Família Guttiferae (Clusiaceae)

A família Guttiferae, segundo alguns autores, é dividida em seis subfamílias, Kielmeyeroideae, Calophylloideae, Clusioideae, Moronoboideae, Lorostemoneideae e Hypericoideae - esta última incluindo os gêneros *Hypericum*, *Cratoxylum*, *Harungana*, *Psorospermum* e *Vismia* (CRONQUIST, 1981; BENNETT e LEE, 1989). Entretanto, a subfamília Hypericoideae é frequentemente classificada como uma família independente (ROBSON, 1977). Entre os gêneros pertencentes a essa subfamília, o mais estudado é *Hypericum* que engloba várias espécies utilizadas na medicina tradicional em diversas partes do mundo.

1.2 Gênero *Hypericum*

1.2.1 Taxonomia

O gênero *Hypericum* possui mais de 450 espécies distribuídas pelo mundo, principalmente em regiões temperadas do hemisfério norte. Essas espécies pertencem a 30 seções taxonômicas (ROBSON, 1977, 1990), sendo que aquelas nativas do Rio Grande do Sul são pertencentes à seção *Trigynobrathys*, com exceção de *H. piriai* Arechav. e *H. gentianoides* (L) Britton, que pertencem à seção *Brathys*. A divisão taxonômica é baseada em características como presença de glândulas negras e/ou pálidas, distribuição geográfica, entre outras (ROBSON, 1981). A espécie em estudo, *Hypericum*

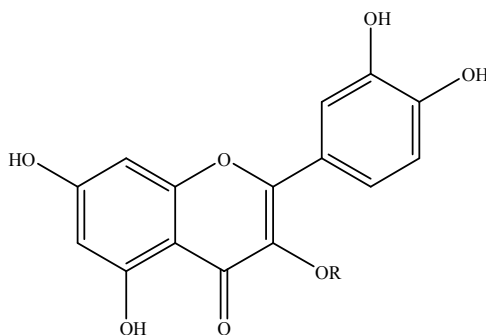
polyanthemum, pertence à seção *Trigynobrathys* a qual compreende 52 espécies (ROBSON, 1990).

1.2.2 Espécies nativas do sul do Brasil

Muitos estudos têm avaliado a constituição química e propriedades biológicas de espécies nativas do Sul do país. Verificou-se a presença de flavonóides e taninos (DALL' AGNOL *et al.*, 2003), ácidos fenólicos (DALL' AGNOL *et al.*, 2003; NUNES *et al.*, 2010), xantonas (ROCHA *et al.*, 1994; HAAS, 2010a), derivados de floroglucinol (ROCHA *et al.*, 1995; FERRAZ *et al.*, 2002a; NÖR *et al.*, 2004), óleos voláteis (FERRAZ *et al.*, 2005), benzopiranos (FERRAZ *et al.*, 2001), bem como a ausência de hipericina e derivados (FERRAZ *et al.*, 2002b), consideradas juntamente com hiperforina, substâncias marcadoras químicas da espécie mais estudada, *Hypericum perforatum*, nativa da Europa, Ásia e África (BILIA *et al.*, 2002; LAWVERE e MAHONEY, 2005).

1.2.2.1 Flavonóides

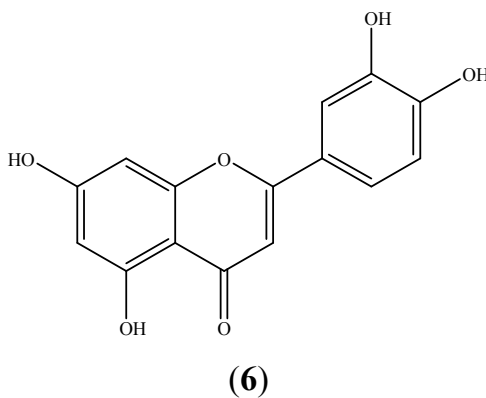
Flavonóides são freqüentes nas espécies de *Hypericum* nativas do sul do país e entre os mais encontrados estão rutina (1), quercetina (2) e seus derivados, hiperosídeo (quercetina-3-O-β-D-galactosídeo) (3), isoquercitrina (quercetina-3-O-glicosídeo) (4), e quercitrina (quercetina-3-O-ramnosídeo) (5) (CROKETT *et al.*, 2005).

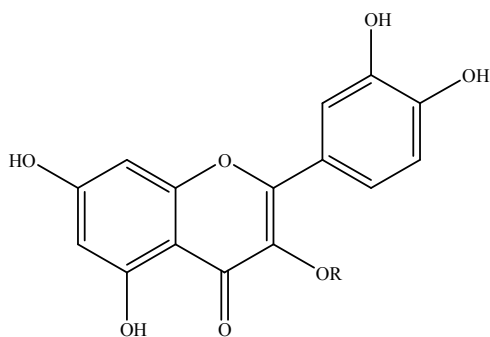


- (1) R= α -L-rutinosil
- (2) R= H
- (3) R= β -D-galactosil
- (4) R= β -D-glicosil
- (5) R= α -L-ramnosil

Rutina está presente em *H. brasiliense* (ABREU *et al.*, 2004) e *H. perforatum* (WU *et al.*, 2002). Ainda, são encontrados traços em *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. ternum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum* (DALL'AGNOL *et al.*, 2003).

Quercetina é encontrada em *H. brasiliense* (ROCHA *et al.*, 1995; ABREU *et al.*, 2004) e *H. perforatum* (WU *et al.*, 2002). Enquanto que a presença de hiperosídeo foi detectada em *H. caprifoliatum*, *H. polyanthemum* (SCHMITT *et al.*, 2001), *H. triquetrifolium* (CONFORTI *et al.*, 2002) e *H. brasiliense*, da qual também foram isolados luteolina (6), quercitrina (5), isoquercitrina (4) e guajaverina (7) (ROCHA *et al.*, 1995).



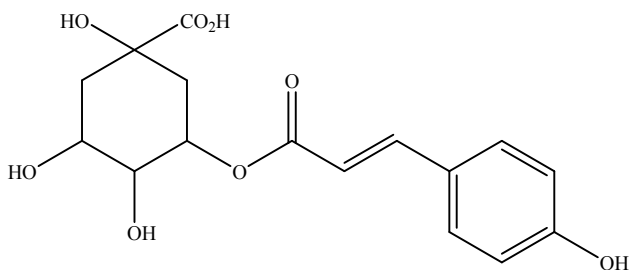


(7) R= α -L-arabinopiranosil

Em um estudo conduzido por Nunes e colaboradores (2010) foi detectada a presença de hiperosídeo, isoquercitrina, guajaverina e quercitrina em *H. campestre*, *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. cordatum*, *H. linoides*, *H. lorentzianum*, *H. megapotamicum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum*, *H. rigidum*, *H. salvadorese*, *H. ternum* e *H. connatum*.

1.2.2.2 Ácidos fenólicos

A presença de ácido clorogênico (8) foi observada em espécies do gênero *Hypericum* como *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. ternum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* (DALL'AGNOL *et al.*, 2003), *H. cordatum*, *H. linoides*, *H. lorentzianum*, *H. megapotamicum*, *H. rigidum* e *H. salvadorese* (NUNES *et al.*, 2010).



(8)

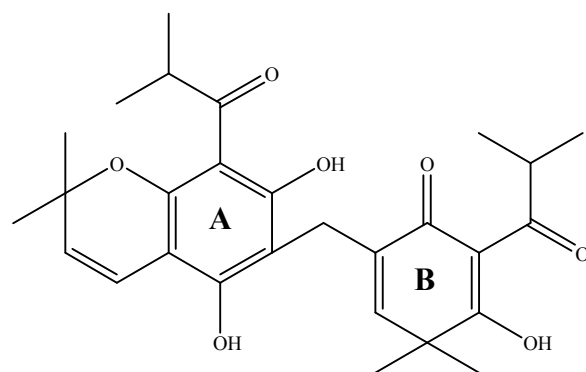
1.2.2.3 Xantonas

Xantonas são metabólitos extensamente encontrados na família Guttiferae. As xantonas já isoladas dessa família incluem as simples oxigenadas, preniladas, e xantolignóides. Normalmente encontram-se na forma livre e substituídas por isoprenóides ou geranóides, ciclizados ou não (WU *et al.*, 1998; KUSTER e ROCHA, 2003).

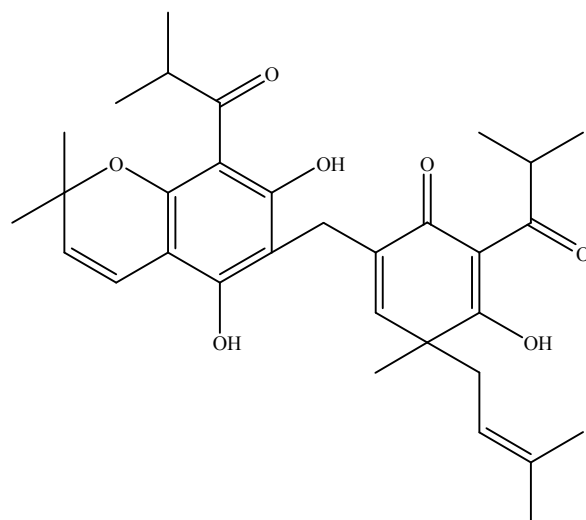
As xantonas mais frequentemente encontradas em *Hypericum* são a mangiferina e a isomangiferina, que estão presentes em aproximadamente 26 e 33 espécies do gênero, respectivamente. Essas xantonas são C-glicosiladas e parecem ser marcadoras taxonômicas em nível da subfamília Hypericoideae (KITANOV e NEDIALKOV, 1998). Esses compostos não foram encontrados nas espécies nativas do Brasil (Nunes *et al.*, 2010). Contudo, em *H. polyanthemum* foi detectada uma xantona não glicosilada com estrutura ainda não totalmente elucidada (HAAS, 2010a).

1.2.2.4 Derivados de floroglucinol

As espécies nativas do Rio Grande do Sul, incluindo a espécie em estudo *H. polyanthemum* apresentam uliginosina B (NÖR *et al.*, 2004) (**9**), assim como *H. myrianthum* e *H. carinatum* (FERRAZ *et al.*, 2002a; BERNARDI *et al.*, 2005). Esse composto é formado de uma unidade floroglucinol (**A**) e uma unidade de ácido filicínico (**B**). Outro composto encontrado nas espécies nativas é o hiperbrasilol B (**10**) isolado de *H. connatum* e *H. caprifoliatum* (NÖR *et al.*, 2004).

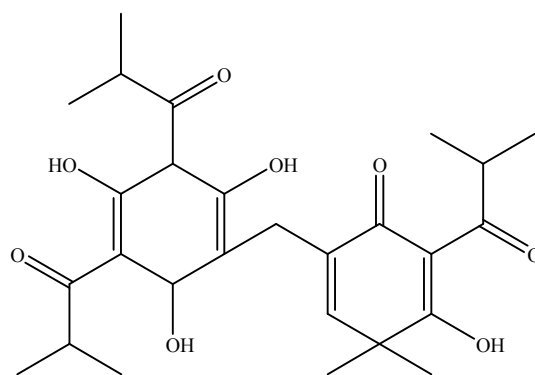


(9)



(10)

Hypericum brasiliense, espécie nativa do sudeste do Brasil, apresenta os derivados japonicina A (11), hiperbrasilol A, B e C, isohiperbrasilol B, isouliginosina B e uliginosina A, esta última também presente em *H. uliginosum* (ROCHA *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 1996; ABREU *et al.*, 2004). O composto japonicina A é formado por duas unidades de ácido filicínico enquanto os outros compostos são formados por uma unidade floroglucinol e uma de ácido filicínico.



(11)

De acordo com FERRAZ e colaboradores (2002a), espécies das seções *Brathys* e *Trigynobrathys* são fontes de derivados de floroglucinol com estrutura dimérica, sugerindo que essa classe de compostos seja marcadora taxonômica das seções.

1.2.2.5 Óleos voláteis

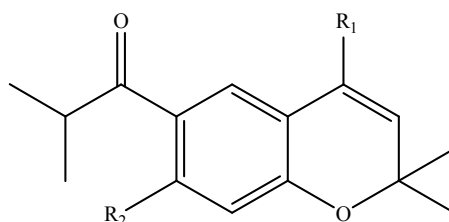
Óleos voláteis de *Hypericum* têm sido bastante estudados ao longo dos anos (CAKIR *et al.*, 2005), porém pouco se sabe sobre as espécies nativas do Rio Grande do Sul.

Em estudo realizado com determinadas espécies nativas, verificou-se a presença dos óleos voláteis nonano (*H. caprifoliatum*), β -cariofileno (*H. carinatum* e *H. ternum*), undecano (*H. myrianthum*) e benzopiranos HP1, HP2 e HP3 (*H. polyanthemum*) (FERRAZ *et al.*, 2005a).

1.2.2.6 Benzopiranos

No gênero *Hypericum*, benzopiranos são uma classe de compostos restrita a espécie *H. polyanthemum*, sendo descritos 6-isobutiril-5,7-dimetóxi-2,2-dimetil-

benzopirano (HP1) (12), 7-hidróxi-6-isobutiril-5-metóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP2) (13) e 5-hidróxi-6-isobutiril -7-metóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP3) (14) (FERRAZ *et al.*, 2001).



(12) $R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OCH}_3$

(13) $R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OH}$

(14) $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$

1.2.3 *Hypericum polyanthemum*

Hypericum polyanthemum Klotzsch ex Reichardt (Figura 1) possui como principais metabólitos secundários o derivado de floroglucinol uliginosina B (7) e os benzopiranos HP1 (12), HP2 (13) e HP3 (14), sendo eles responsáveis pelas atividades biológicas atribuídas a essa espécie.

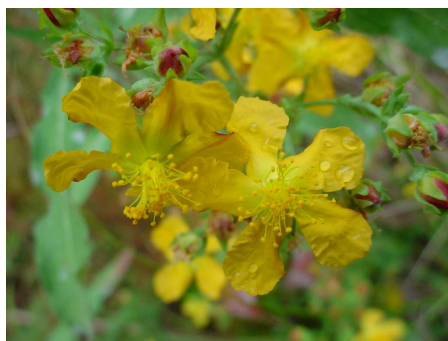


Figura 1. *Hypericum polyanthemum* (foto: Gilsane von Poser)

Dentre as atividades biológicas atribuídas a uliginosina B, destacam-se potencial antimicrobiano (DALL' AGNOL *et al.*, 2003) e antinociceptivo não mediado pelo sistema opióide (STOLZ *et al.*, 2009). Para os benzopiranos, estudos demonstram efeito inibidor da monoaminoxidase (GNERRE *et al.*, 2001), antimicrobiano (DALL' AGNOL *et al.*, 2005), antitumoral (FERRAZ *et al.*, 2005), antinociceptivo (HAAS *et al.*, 2010b), entre outros.

1.3 Cultivo *in vitro*

As plantas possuem capacidade de se regenerar totalmente a partir de suas células e tecidos. Essa capacidade de totipotência permite que as células somáticas vegetais se dividam, se diferenciem em plântulas e expressem capacidades bioquímicas diferenciadas quando cultivadas sob condições apropriadas (FRANÇA, 2003).

A cultura de um tecido vegetal é feita de um explante, que pode ser um fragmento de folha, raiz, caule ou qualquer outro segmento que responda as condições de indução do meio de cultura, com vistas à regeneração vegetal *in vitro* (TORRES *et al.*, 2000). Os explantes são uma mistura de células em estados diferentes: fisiológico, bioquímico e de desenvolvimento. Assim, a exposição destes a um ambiente *in vitro* leva a reações diferenciadas nos diversos tipos celulares, fazendo com que somente algumas células desse explante respondam às condições de cultura, levando a regeneração de um novo indivíduo (MANTELL *et al.*, 1994).

A diferenciação celular é um processo que depende da interação de três fatores: fator genético, fator ontogênico e características ambientais. O fator genético se refere ao genótipo que pode ser expresso durante o processo, o fator ontogênico às características adquiridas durante o processo inicialmente por estímulo ambiental, mas que podem se tornar permanentes e por fim, as características ambientais que dependem somente do ambiente para se expressarem (KERBAUY, 1997).

A regeneração das plantas pode ocorrer por organogênese, embriogênese somática ou micropropagação. A organogênese é uma via de diferenciação na qual órgãos vegetais (brotos, raízes) ou ambos são induzidos à diferenciação a partir de uma ou várias células. Na embriogênese somática, a formação de embriões é dada a partir de células somáticas. A micropropagação toma por base os meristemas somáticos. É denominada assim devido ao emprego de porções pequenas de explantes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A regeneração de plântulas através de brotos e não de calos, mostra-se uma técnica apropriada para a preservação de genótipos produtores de compostos medicinais (ROUT *et al.*, 2000; FRANÇA, 2003).

A micropropagação compreende quatro estágios principais: estágio 0, onde há preparação das plantas para o estabelecimento da cultura por meio de tratamentos de desinfestação que visam diminuir a contaminação do ambiente quando estas forem introduzidas *in vitro* (DEBERGH e READ, 1991); o estágio I estabelece o implante no meio de cultivo; o estágio II possibilita a multiplicação ou indução de brotos múltiplos; No estágio III ocorre a formação de raízes e, por fim, o estágio IV é a fase de aclimatação, com a transferência gradual das plantas para a condição *ex vitro* (NIKLAS, 1986; HARTMANN *et al.*, 2002).

O meio de cultivo deve ser composto basicamente de um suporte semi-sólido, nutrientes, energia e vitaminas. Dependendo da cultura, há necessidade de adição de fitorreguladores a fim de regenerar ou propagar as plântulas (HARTMANN *et al.*, 2002). É necessário levar em consideração a diferença entre indivíduos, pois diferentes clones podem ter respostas às condições de cultura distintas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Os meios mais utilizados na cultura de tecidos vegetais são MS (MURASHIGUE e SKOOG, 1962) e Gamborg B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), que diferem na concentração dos componentes.

Além dos componentes básicos, reguladores de crescimento são utilizados para iniciar e manter a divisão celular (REINERT e YEOMAN, 1982; ROUT *et al.*, 2000; RAMACHANDRA RAO e RAVISHANKAR, 2002). Esses compostos podem ser produzidos pelas plantas naturalmente (fitormônios) ou serem de origem sintética (fitoreguladores). Dentre os reguladores de crescimento, as citocininas, auxinas, giberelinas, ácido abscísico e etileno desempenham papel importante no crescimento e morfogênese da cultura de tecidos, modulando divisão celular e indução e proliferação de brotações adventícias (GEORGE e SHERRINGTON, 1984; HARTMANN *et al.*, 2002; TERMIGNONI, 2005).

O sucesso do cultivo *in vitro* depende de diversos fatores. Assim, cada espécie vegetal requer um protocolo de micropropagação diferenciado, devido às diferenças na resposta morfo genética *in vitro* não apenas entre indivíduos do mesmo gênero, mas em indivíduos da mesma espécie (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; ROUT *et al.*, 2000).

Devido às potenciais atividades farmacológicas de extratos e produtos isolados de espécies de *Hypericum*, protocolos de micropropagação *in vitro* têm sido desenvolvidos, para a multiplicação e produção de metabólitos secundários dessas espécies (CARDOSO e OLIVEIRA, 1996; KARTINIG *et al.*, 1996; BAIS *et al.*, 2002; ZOBAYED *et al.*, 2004; COUCEIRO *et al.*, 2006; BERNARDI *et al.*, 2007a; BERNARDI *et al.*, 2007b).

O estabelecimento de protocolos para cultivo de plantas medicinais com concentrações padronizadas dos componentes é necessário para fins industriais e de pesquisa (MURCH *et al.*, 2002; ZOBAYED *et al.*, 2003). Em *Hypericum polyanthemum* foi demonstrado que plantas aclimatadas fornecem biomassa com habilidade de acumular benzopiranos e outros compostos fenólicos. No entanto, a concentração dos metabólitos é afetada pelo estágio de maturação e pela parte da planta, com maior acúmulo observado nos estágios iniciais de florescimento e diminuição do acúmulo após 20 semanas de

cultivo a campo (BERNARDI *et al.*, 2008). Estudos demonstram que o protocolo utilizado para o cultivo *in vitro* pode ser facilmente reproduzido, e, portanto, mostra-se adequado para a o crescimento uniforme e alto rendimento de compostos medicinais provenientes de *H. polyanthemum* (NUNES *et al.*, 2009 a,b).

1.4 Aclimação (cultivo *ex vitro*)

Quando as plantas são transferidas para ambientes *ex vitro* ficam expostas ao estresse abiótico (temperatura, intensidade da luz e umidade) e biótico (como a microbiota do solo), e assim se faz necessária a aclimação para as mesmas sobreviverem e crescerem (DEB e IMCHEN, 2010). A transferência e aclimação para o ambiente *ex vitro* é a etapa final em um sistema de cultivo de espécies vegetais e a mais importante para o sucesso da micropropagação (PREECE e SUTTER, 1991; POSPSILOVÁ *et al.*, 1999).

A aclimação é o processo de transferência de explantes da condição heterotrófica para a autotrófica (HARTMANN *et al.*, 2002). Nesse processo, também ocorre a transferência de uma situação de fluxo transpiratório reduzido para um ambiente externo em que a taxa de transpiração é maior, podendo ser um fator de estresse hídrico (PREECE e SUTTER, 1991; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; HAZARIKA, 2003; WALTERS, 2005). Para o sucesso do processo de aclimação, há fatores que devem ser considerados como a habilidade da planta em passar da condição heterotrófica para a autotrófica, exposição a fatores abióticos (umidade relativa, temperatura, luminosidade, tipo de substrato, entre outros) e fatores bióticos (microrganismos, pragas, doenças), capacidade de produção de novas raízes e assim, de absorção de nutrientes do solo (PREECE e SUTTER, 1991; HARTMANN *et al.*, 2002; PAIVA e OLIVEIRA, 2006).

A baixa luminosidade e alta umidade relativa nas condições de cultivo *in vitro* dificultam a adaptação de algumas espécies vegetais em condições autotróficas

(PEDROTTI e VOLTOLINI, 2001). A mortalidade dos vegetais durante o processo de transferência para o ambiente *ex vitro* é alta, visto que as mesmas nas condições *in vitro* possuem determinadas características como estômatos não funcionais, enraizamento fraco e cutícula pouco desenvolvida (MATHUR *et al.*, 2008). A planta deve desenvolver mecanismos de controle de transpiração e condutância estomática (DÍAZ-PEREZ *et al.*, 1995), ativar o controle de perda de água pelas células (SUTTER, 1988) e aumentar a taxa fotossintética em condições atmosféricas normais (VANTELGEN *et al.*, 1992). Em muitas espécies, as folhas não se adaptam a condição *ex vitro* e são substituídas por novas folhas (PREECE e SUTTER, 1991).

A capacidade de sobrevivência da planta em um ambiente *ex vitro* está relacionada à capacidade de captação da radiação solar para a fixação de carbono e absorção de água para a translocação de minerais e fotoassimilados (PAIVA e OLIVEIRA, 2006), essenciais para o crescimento da planta (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A umidade relativa é um fator muito importante para a sobrevivência das plantas, levando em consideração o pouco controle de transpiração que a planta apresenta (PREECE e SUTTER, 1991; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

1.5 Cultivo a campo

O cultivo de plantas medicinais *in vitro* tem sido amplamente discutido como fonte para obtenção de produtos naturais, sendo o cultivo em larga escala uma das alternativas tecnologicamente viáveis para produção comercial de metabólitos secundários de importância para a indústria (VERPOORTE, 2000). É crescente o interesse na utilização de métodos de cultivo controlado em larga escala, a fim de manter controle mais rígido sobre a qualidade do produto. O cultivo possibilita a otimização do rendimento das plantações e oferece um produto com qualidade mais uniforme. No entanto, algumas espécies têm seu cultivo dificultado pela baixa taxa de germinação ou requisitos ecológicos específicos. A utilização de ambientes controlados se faz necessária para o

crescimento de espécies vegetais que requerem determinadas condições de crescimento, mas que possuem importante valor comercial (POSPSILOVÁ *et al.*, 1999; CANTER *et al.*, 2005). Ainda, sistemas de crescimento controlado tornam possível a manipulação da concentração de metabólitos ativos presentes nas plantas.

Estudos com espécies de *Hypericum* têm sido conduzidos a fim de avaliar os parâmetros de cultivo em larga escala. BUTTER e colaboradores, (1998), avaliaram o desempenho de sete linhagens de *H. perforatum* em três localidades por dois anos consecutivos e os resultados demonstraram diferença significativa do ambiente e fatores genéticos na época do florescimento, crescimento e produção de biomassa. Foram observadas também variação de metabólitos secundários em flores. Para os autores, a variação dos teor dos metabólitos se deve, ainda que parcialmente, aos diferentes estágios das plantas analisadas e fatores genéticos.

Porém, estudos com *H. perforatum* demonstraram adicionalmente que a produção de hipericinas foi seis vezes superior no cultivo *in vitro* e os teores de hiperforina foram inferiores aos de plantas cultivadas a campo (KIRAKOSYAN *et al.*, 2003; KIRAKOSYAN *et al.*, 2004).

1.6 Estresse biótico

Plantas são organismos sésseis que dependem da plasticidade fenotípica para se remodelarem em períodos de desenvolvimento para suportar condições ambientais e responder ao estresse biótico e abiótico (DREHER e CALLIS, 2006). Estudos demonstram que interações plantas-microrganismos desempenham papel importante na estruturação de comunidades vegetais, afetando colonização, competição, coexistência e dinâmica dos nutrientes do solo (GRIME *et al.*, 1987; HARTNETT *et al.*, 1993; MARON *et al.*, 1996; HARTNETT e WILSON, 1999).

Mutualismos e interações positivas entre plantas e microrganismos podem afetar intensamente a estrutura de comunidades (BEVER *et al.*, 1997; HARTNETT e WILSON 1999; STACHOWICZ, 2001; BRUNO *et al.*, 2003). Porém, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não foi totalmente elucidado (CLAY 1994; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1998; WARDLE, 2002)

As plantas estão continuamente expostas ao ataque de microrganismos, sejam eles patogênicos ou não. Para a proteção, os vegetais desenvolveram mecanismos diferenciados de defesa que quando acionados, percebem a agressão e descadeiam uma resposta apropriada e de forma adaptativa (SHEWRY e LUCAS, 1997; PIETERSE *et al.*, 2005; WIT, 2007).

A indução da resistência é um estado de ativação contra doenças sistematicamente induzido por indutores bióticos ou abióticos, de maneira não específica, por meio da ativação de genes que codificam para diversas formas de defesa (STADNIK, 2000; HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2001). A atividade do agente indutor ocorre devido a capacidade do mesmo em sensibilizar a planta para a ativação de mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos em resposta à presença de uma agente externo. A indução da resistência envolve três fenômenos: Resistência Local ou Resposta Hipersensível, Resistência Sistêmica Adquirida e Resistência Sistêmica Induzida.

A resistência local ou resposta hipersensível ocorre quando a infecção por microrganismos - patogênicos ou não - induzem mudanças drásticas na atividade metabólica das células vegetais ao redor do sítio de infecção, com alteração da permeabilidade da plasmalema, rápido movimento e agregação citoplasmática, elevação das taxas de respiração, liberação de eletrólitos e síntese de fitoalexinas que levam a formação de halos necróticos no local de infecção e por fim, confinamento do microrganismo (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996; DURRANT e DONG, 2004).

A Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e a Resistência Sistêmica Induzida (RSI) são mecanismos semelhantes que culminam em uma resposta generalizada (STICHER *et al.*, 1997; CONRATH *et al.*, 2006). Na RSA ocorre a manifestação ou produção de um sinal liberado a partir do sítio de infecção que provoca necrose e translocação deste sinal para outras partes da planta, desencadeando reações de defesa contra agressões subseqüentes. Na RSI não ocorre necrose local, porém induz a planta a se proteger sistematicamente. Em ambos os processos ocorre modificação na parede celular, síntese de fitoalexinas, aumento da expressão de alguns genes (WARD *et al.*, 1991) incluindo os das proteínas relacionadas a patogênese (somente na RSA) (VAN LOON e VAN STRIEN, 1999).

O processo de indução de resistência envolve três passos principais: Reconhecimento que se dá por meio de um elicitor, produzido pelo microrganismo, através de um receptor na parede celular da célula vegetal desencadeando a sinalização e a produção de compostos de defesa (LA BANCA, 2002). Sinalização, onde a planta reconhece o sinal primário para desencadear a defesa. Nesse contexto, estudos têm revelado a presença de moléculas sinalizadoras, os fitormônios ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno (KOORNNEEF e PIETERSE, 2008) com um papel primário no arranjo das respostas de defesa, porém moléculas adicionais produzidas pelo invasor, eventualmente, modelam fortemente o complexo de sinais de defesa específicos para cada invasão (CONRATH, 2006; GOELNER e CONRATH, 2008). E, por fim, respostas de defesa, onde barreiras estruturais e bioquímicas se manifestam. Essas respostas são divididas em barreiras pré-formadas e pós formadas, ou seja, atuam antes ou depois da invasão pelo microrganismo (SILVA *et al.*, 2008).

A literatura descreve vários produtos de fungos como proteínas, glicoproteínas e oligossacarídeos como desencadeadores de mecanismos de defesa nas plantas (DMITRIEV, 2003) aumentando a concentração dos metabólitos secundários das mesmas. Nesse contexto, o presente trabalho visa à associação do fungo

entomopatogênico *N.rileyi* com *H. polyanthemum* visando à otimização da produção de seus metabólitos secundários principais.

1.7 Fungos entomopatogênicos

Fungos entomopatogênicos são reconhecidos como aqueles que parasitam insetos, ácaros e carrapatos, além do grande potencial de uso como biopesticidas (BUTT *et al.*, 2001; GOETTEL *et al.*, 2005; VINCENT *et al.*, 2007).

Atualmente, como biopesticidas mais de 170 produtos com base em pelo menos 12 espécies de fungos (FARIA e WRIGHT, 2007) são produzidos. Apesar de existirem cerca de 700 espécies de fungos entomopatogênicos, pertencentes a aproximadamente 90 gêneros (ROBERTS e HUMBER, 1981), a maioria dos fungos produzidos industrialmente pertence aos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* e *Isaria* pela facilidade de produção de massa.

Recentemente, descobriu-se que muitos fungos entomopatogênicos possuem funções adicionais na natureza, como endófitos de plantas, antagonistas de fitopatógenos, associações benéficas na rizosfera e até mesmo promotores de crescimento de plantas, sendo as duas últimas funções ainda pouco estudadas (VEGA *et al.*, 2009). O fungo em estudo neste trabalho não foi investigado quanto a possibilidade de atuar como endófito. No entanto, essa possibilidade não deve ser excluída uma vez que o mesmo apresenta proximidade taxonômica com fungos do gênero *Beauveria*, reconhecidos como agentes endófitos.

Fungos endófitos infectam tecidos vegetais sem causar danos. Esses fungos possuem imensa variedade e papéis variados na natureza (SAIKKONEN *et al.*, 2006; ARNOLD e LUTZONI, 2007). Alguns endófitos protegem as plantas de patógenos e herbívoros (ARNOLD *et al.*, 2003; ARNOLD e LEWIS, 2005; SCHULZ e BOYLE,

2005; RUDGERS *et al.*, 2007) e alguns fungos reconhecidos como patógenos de insetos (entomopatogênicos) foram isolados como endófitos, incluindo *Acremonium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Clonostachys* e *Isaria* (VEGA, 2008; VEGA *et al.*, 2008). Entre estes, destacam-se *Beauveria bassiana* como protetor de plantações de *Zea mays* (BING e LEWIS, 1991, 1992; WAGNER e LEWIS, 2000), *Theobroma gileri* (EVANS *et al.*, 2003) e *Carpinus caroliniana* (BILLS e POLISHOOK, 1991) de sementes de *Pinus monticola* (GANLEY e NEWCOMBE, 2005), *Papaver somniferum* (QUESADA-MORAGA *et al.*, 2006), culturas de *Musa paradisiaca* (AKELLO *et al.*, 2007) e *Coffea arabica* (POSADA *et al.*, 2007).

Os antagonistas de fitopatógenos produzem vários metabólitos como antibióticos, compostos voláteis bioativos e enzimas, além de provocarem os mecanismos de competição (pelo sítio de infecção, carbono, nitrogênio, minerais), parasitismo, hipovirulência, resistência sistêmica induzida e aumentar a resposta das plantas ao agente externo (OWNLEY e WINDHAM, 2007). Dentre os fungos entomopatogênicos já estudados, *B. bassiana* (OWNLEY *et al.*, 2004; OWNLEY, *et al.*, 2008 a, b) e algumas espécies de *Lecanicillium* (ASKARY *et al.*, 1998; BENHAMOU e BRODEUR, 2000, 2001; KIM *et al.*, 2007, 2008) já foram identificadas como antagonistas de fitopatógenos.

O fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson é conhecido como agente de controle biológico de lepidópteros, praga de diversas culturas. A consistência de ocorrência e os altos índices de controle natural obtidos com *N. rileyi* sugerem a consideração deste como um componente importante de programas de manejo integrado de pragas (SUJII *et al.*, 2002).

Em geral, os fungos entomopatogênicos têm a capacidade de penetrar na cutícula de certos insetos. Durante seu ciclo de desenvolvimento, muitos desses fungos produzem uma gama de metabólitos secundários bioativos, como destruxinas (PAIS *et al.*, 1981), miroridinas (KONDO *et al.*, 1980), citochalasinina (ALDRIDGE e TURNER, 1969) e

aurovertinas (AZUMI *et al.*, 2008) de *Metharizium anisopliae* e bassianina (COUTTS e HIDMARSH, 1969), beauvericina (HAMILL *et al.*, 1969), bassianolideo (SUZUKI *et al.*, 1977), beauverolideos (ELSWORTH e GROVE, 1977) e tenelina (MACLEOD, 1954) de *Beauveria bassiana*. Alguns estudos demonstram que metabólitos produzidos por *Nomuraea rileyi* são tóxicos para insetos e microrganismos (IGNOFFO *et al.*, 1976; WASTI e HARTMANN, 1978). Porém, poucos destes caracterizam quimicamente estes produtos .

Em virtude da escassez de dados na literatura sobre *Nomuraea rileyi*, este estudo visa a associação deste fungo entomopatogênico com *Hypericum polyanthemum* a fim de verificar a alteração dos metabólitos específicos da planta, bem como a utilização deste microrganismo como desencadeador de defesa vegetal.

2. OBJETIVOS

A partir dos protocolos de propagação *in vitro* (BERNARDI *et al.*, 2007b) e *ex vitro* (BERNARDI *et al.*, 2008) estabelecidos para *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt, serão realizados experimentos de estresse biótico com o fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e a avaliação do acúmulo de metabólitos polares e apolares.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão apresentados na forma de manuscrito científico:

- I. Effect of the biotic elicitation with the fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson in the secondary metabolism of acclimatized *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt plants.

3. MANUSCRITO

“Effect of the biotic elicitation with the fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson in the secondary metabolism of acclimatized

Hypericum polyanthemum Klotzsch ex Reichardt plants”

Manuscrito submetido ao periódico científico Phytochemistry

Carta de submissão do artigo:

Elsevier Editorial System(tm) for Phytochemistry
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Effect of the biotic elicitation with the fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson in the metabolism of acclimatized *Hypericum polyanthemum* plants

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Chemistry

Keywords: *Hypericum polyanthemum*; biotic elicitation; fungus; *Nomuraea rileyi*

Corresponding Author: Dr. Gilsane Von Poser,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Gabriela C Meirelles

Order of Authors: Gabriela C Meirelles; Amanda V Pinhatti; Daniel Sosa-Gomez; Luis Mauro G Rosa; Sandra B Rech; Gilsane Von Poser

Abstract: Changes in biomass and bioactive metabolites after elicitation with the fungi *Nomuraea rileyi* added as dried culture (DC) or as dried autoclaved cell powder (DACP) for short and long periods of time have been investigated in *Hypericum polyanthemum* plants grown under controlled conditions and after 18 weeks of field acclimatization. Controlled grown plants treated with DACP showed increased concentrations of the benzopyrans HP1 (6-isobutyryl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethylbenzopyran), HP2 (7-hydroxy-6-isobutyryl-5-methoxy-2,2-dimethylbenzopyran), and HP3 (5-hydroxy-6-isobutyryl-7-methoxy-2,2-dimethylbenzopyran) while the DC affected negatively or did not alter the synthesis of these compounds. Moreover, lower levels of the phloroglucinol derivative uliginosin B were detected in all treatments. Long time treatment of field grown acclimatized plants with DACP triggered plant growth doubling the biomass in the studied period and chemical analyses demonstrated increased total phenolic compounds (TCP) yields in the vegetative parts of plants submitted to all treatments. Nevertheless, the HPLC analysis showed different pattern of metabolites accumulation, with higher yields of HP1, HP2, HP3 and uliginosin B accumulated in the reproductive parts of the plants treated with DACP during all experiment. The elevation of bioactive metabolites levels in response to the elicitor suggests that these compounds are inducible in plant defense response of *H. polyanthemum*.

As páginas 31 a 56 desta Dissertação referem-se ao artigo “Effect of the biotic elicitation with the fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson in the secondary metabolism of acclimatized *Hypericum polyanthemum* Klotzsech ex Reichardt plants”, submetido ao periódico *Phytochemistry*.

Neste trabalho modificações na biomassa vegetal e no teor de metabólitos bioativos de plantas *Hypericum polyanthemum* Klotzsech ex Reichardt cultivadas sob condições controladas e após 18 semanas de aclimação foram investigadas após a elicitação com o fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson através da adição do microrganismo liofilizado e pulverizado (LP), ou liofilizado, autoclavado e pulverizado (LAP) por curtos e longos períodos de tempo. Foram observados aumentos da biomassa vegetal e no teor de metabólitos secundários principalmente no tratamento contínuo com LAP, o que sugere que estes compostos são induzíveis na resposta de defesa de *H. polyanthemum*. Os resultados obtidos neste trabalho são relevantes em virtude da planta não sofrer danos. Assim, o sistema descrito representa uma nova abordagem em estudos com *H. polyanthemum* visando otimizar condições para a produção de biomassa e metabólitos secundários de interesse medicinal.

4. DISCUSSÃO GERAL

Plantas de *Hypericum polyanthemum* cultivadas *in vitro* sob condições controladas e plantas cultivadas em campo aberto foram tratadas com o fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi*. Primeiramente, plantas cultivadas *in vitro*, mantidas em mistura estéril de solo comercial não fertilizado: vermiculita (1:2) foram expostas a diferentes tempos de contato com o microrganismo liofilizado, autoclavado e pulverizado (LAP): 24 horas, 48 horas, 72 horas e 7 dias. Posteriormente, outros exemplares de *H. polyanthemum*, cultivados sob as mesmas condições, receberam o fungo apenas liofilizado e pulverizado (LP) por um período de 7 dias. As plantas foram avaliadas em relação a suas características macroscópicas e seus metabólitos secundários principais, os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 e o derivado de floroglucinol uliginosina B. De acordo com as características macroscópicas, as plantas não apresentaram qualquer sinal de injúria, doença ou mortalidade. No entanto, demonstraram diferentes padrões de acúmulo de seus metabólitos de acordo com os tratamentos como mostra o fluxograma a seguir:

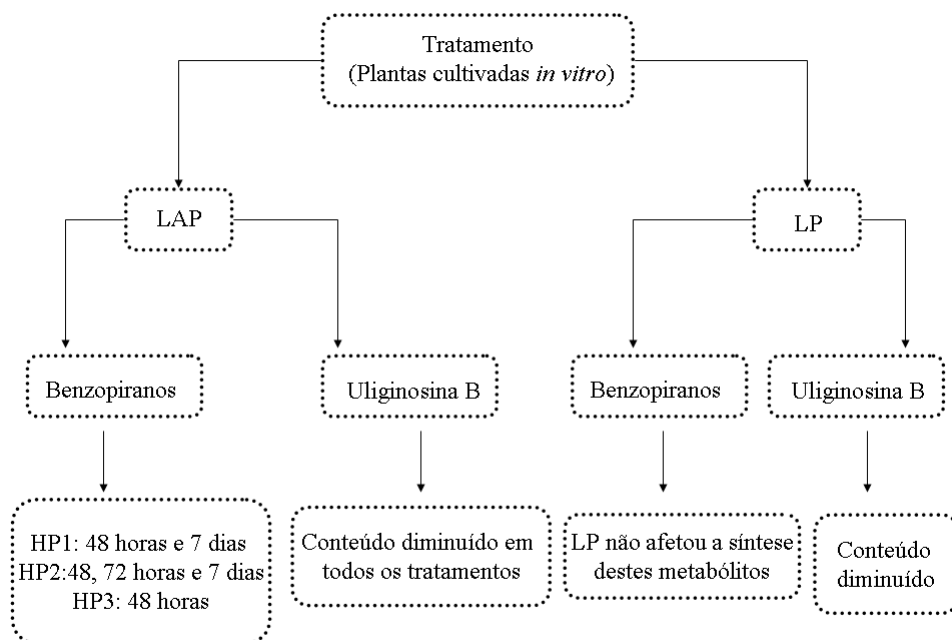


Figura 2. Fluxograma representativo dos tratamentos a que plantas de *H. polyanthemum* cultivadas *in vitro* foram submetidas, e respectivos resultados.

Considerando que o fungo *N. rileyi* não causou nenhum tipo de lesão ou mortalidade nas plantas, bem como não houve a disseminação do microrganismo, o mesmo experimento foi conduzido com a espécie cultivada em campo aberto. Os tratamentos foram semelhantes aos do primeiro experimento, com as plantas sendo tratadas por períodos curtos de tempo com LAP (24, 48 e 72 horas), tratamento contínuo semanal por 16 semanas com LAP e tratamento por 7 dias com LP. As plantas foram coletadas com 18 semanas de cultivo, período no qual há maior acúmulo dos metabólitos bioativos em *H. polyanthemum* (BERNARDI *et al.*, 2008).

O padrão de acúmulo dos benzopiranos foi diferente nas plantas cultivadas a campo, com maiores teores nas partes reprodutivas tratadas continuamente com LAP. Um panorama dos resultados obtidos está representado no fluxograma abaixo:

A aplicação de elicitores exógenos a culturas *in vitro* é estudada para avaliar a resposta das plantas a ataques de insetos ou microrganismos, assim como visa aumentar a produção de metabólitos secundários (WALKER *et al.*, 2002). Porém, por vezes a elicitação positiva não é encontrada. Estudos demonstram que após o tratamento com elicitores, as espécies vegetais desencadeiam uma série de reações de defesa, incluindo o acúmulo de metabólitos secundários específicos, tanto em plantas como em culturas celulares (ZHAO *et al.*, 2005). O aumento da concentração dos metabólitos pode ser descrito como uma resposta de defesa desencadeada por alguns componentes existentes no elicitor fúngico, como proteínas, glicoproteínas e oligossacarídeos (DMITRIEV, 2003; KOSKIMÄKI *et al.*, 2009).

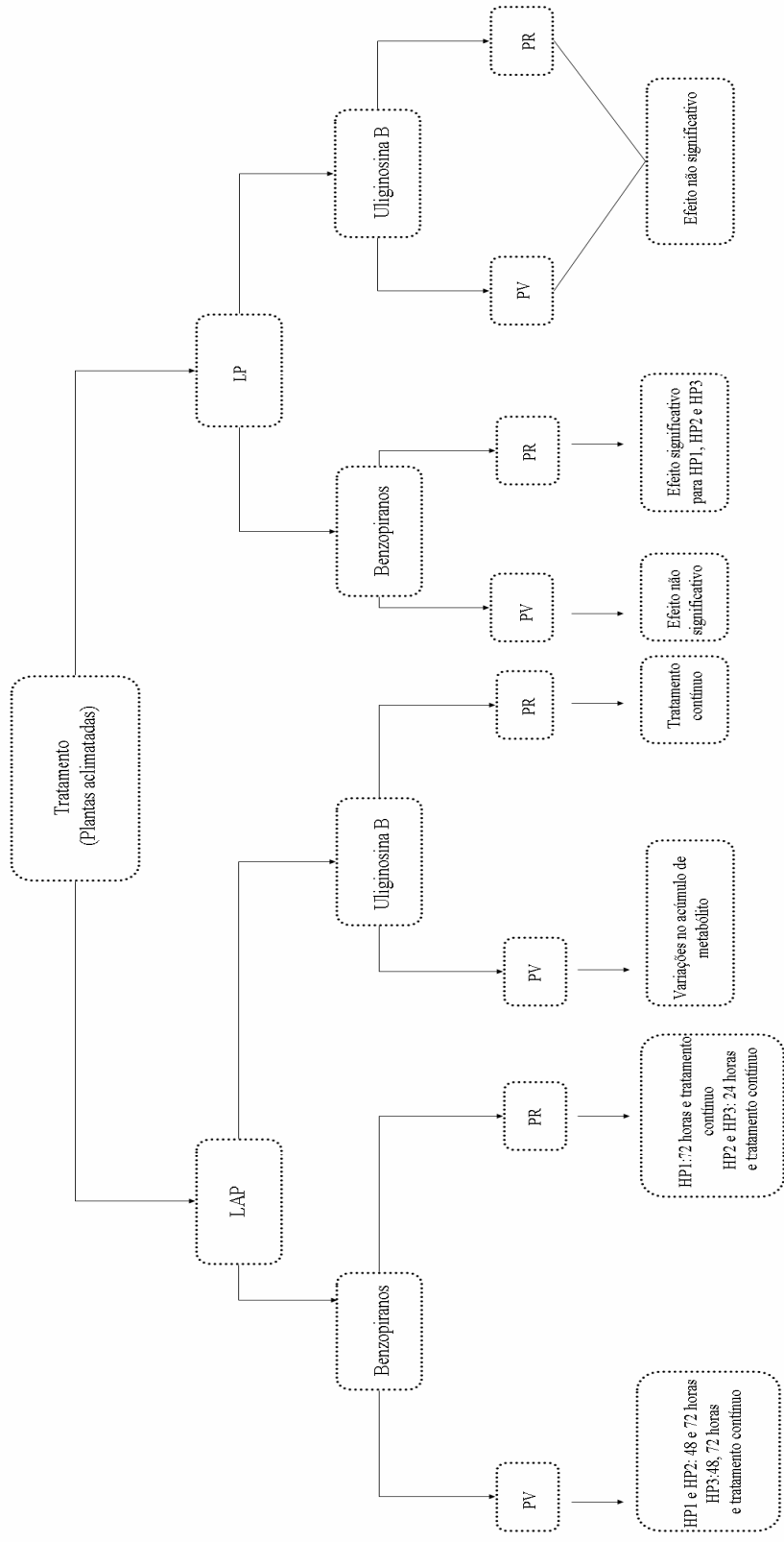


Figura 3. Fluxograma representativo dos tratamentos a que plantas de *H. polyanthemum* cultivadas a campo foram submetidas, e respectivos resultados. PV (partes vegetativas), PR (partes reprodutivas).

Elicitores fúngicos, principalmente os derivados da parede celular de microrganismos, são reconhecidos por induzir a síntese *de novo* de fitoalexinas, as quais estão envolvidas na defesa das plantas contra microrganismos patogênicos (SZABO *et al.*, 1999). Além disso, certos fungos, como os endófitos e alguns entomopatogênicos já reconhecidos como endofíticos, podem beneficiar as plantas por promover seu crescimento (DAI *et al.*, 2008), aumentando a resistência contra múltiplos estresses (LEWIS, 2004; MALINOWSKI *et al.*, 2004) e protegendo contra doenças e insetos (WILKINSON *et al.*, 2000; TANAKA *et al.*, 2005; VEGA *et al.*, 2008). Estudos demonstram que além de microrganismos, elicitores como jasmonatos (SIRVENT e GIBSON, 2002; WALKER *et al.*, 2002), salicilatos (SHAH *et al.*, 1999), quitosana, ácido giberélico (NGE *et al.*, 2006) e extrato de levedura (CHEN *et al.*, 2001) atuam como promotores de aumento de síntese de metabólitos secundários pelas plantas.

Ainda, fitopatógenos podem se transformar em fungos endófitos quando em contato com as plantas e viver em associação com as espécies vegetais sem causar dano aparente (CARROL, 1988; FREEMAN e RODRIGUEZ, 1993; SAIKKONEN *et al.*, 1998), embora possam ser danosos para as plantas em situações de estresse (CLAY e SCHARDL, 2002; SCHULZ e BOYLE, 2005). A colonização de plantas por endófitos resulta na secreção de hidrolases da célula vegetal, a fim de limitar o crescimento do microrganismo. Assim, os responsáveis pela elicitação são fragmentos do microrganismo endófito. No entanto, como o microrganismo é capaz de sobreviver com altas concentrações dos metabólitos das plantas, ainda é desconhecido (GAO *et al.*, 2010).

O tratamento contínuo com LAP provocou aumento de biomassa em plantas de *H. polyanthemum*, sendo a biomassa total de $2.69 \text{ g} \pm 0.22$ enquanto as plantas tratadas com LP apresentaram uma biomassa de $1.25 \text{ g} \pm 0.06$ e os controles $1.29 \text{ g} \pm 0.045$. Os valores de biomassa encontrados são superiores àqueles encontrados em plantas submetidas à fertilização contínua sob as mesmas condições de cultivo (NUNES *et al.*, 2009b). Além disso, culturas celulares de *Abrus precatorius* elicidadas com extrato de levedura também

demonstraram aumento de biomassa (KARWASARA *et al.*, 2010), enquanto quitosana tem sido utilizada como estimulante do crescimento de culturas de tecidos de orquídeas (NGE *et al.*, 2006). Em contrapartida, elicitores da parede celular do oomiceto *Phytophthora cinnamoni* inibiram o crescimento de culturas celulares de *Hypericum perforatum* tanto em condições de claro, como em condições de escuro (WALKER *et al.*, 2002). O aumento de biomassa visando à maior produção de metabólitos é desejado quando as espécies vegetais são submetidas a qualquer tipo de elicitor. Porém, os elicitores fúngicos por vezes podem provocar efeitos danosos às plantas, como no estudo conduzido por SIRVENT e GIBSON (2002), onde foram observados sintomas de patogenicidade com folhas cloróticas e subsequente necrose em *H. perforatum* tratado com *C. gloesporioides*, necrose esta, tanto mais acentuada quanto maior a dose no inóculo.

Compostos fenólicos tendem a se acumular nas espécies vegetais em situações de estresse. O tratamento contínuo e o contato por 24 horas com LAP provocaram um aumento de duas vezes no teor desses compostos nas partes vegetativas de *H. polyanthemum*, sendo que após 24 horas o teor dos fenólicos decaiu, porém permaneceu superior ao controle. As plantas tratadas com LP também demonstraram acúmulo duas vezes maior dos compostos nas partes vegetativas quando comparadas às plantas controle. No entanto, nas partes reprodutivas os teores dos metabólitos se mantiveram constantes em todos os tratamentos. Apesar de alterações significativas no teor de compostos fenólicos ao longo dos tratamentos, esses dados não podem ser comparados ao perfil do acúmulo dos demais metabólitos analisados neste trabalho, pois certos compostos como HP1, embora classificados como compostos fenólicos devido à rota biossintética não são quantificados pela técnica uma vez que as hidroxilas fenólicas estão substituídas por metilas. CONCEIÇÃO e colaboradores (2006) demonstraram que suspensões celulares de *H. perforatum* apresentaram um perfil de compostos fenólicos diferenciado frente à elicitação com o fungo patogênico *C. gloesporioides*, incluindo acúmulo de uma determinada xantona e síntese de novos compostos. A indução da produção de hipericinas

por *H. perforatum* por inoculação de *C. gloesporoides* (1×10^4 esporos/mL) resultou em um acúmulo de 2 vezes maior quando comparada com o controle, enquanto concentrações superiores do inóculo provocaram danos à planta (SIRVENT e GIBSON, 2002). Ainda, esporos de *Phytophthora capsici* e *Diploceras hypericinum* foram capazes de modular a rota biosintética de hipericina, aumentando a sua biossíntese (CIRAK *et al.*, 2005)

O acúmulo dos flavonóides isoquercitrina e hiperosídeo, assim como do ácido fenólico, ácido clorogênico, também foram avaliados em plantas elicitadas por *N. rileyi*. Apesar de estudos demonstrarem que a resistência vegetal ao ataque de microrganismos pode desenvolver variações no metabolismo secundário de tecidos específicos, inibindo a via sintética dos flavonóides e aumentando a biossíntese de derivados caféicos e cinâmicos (MCLUSKY *et al.*, 1999), os flavonóides isoquercitrina e hiperosídeo apresentaram elevação de seus teores em plantas elicitadas. Os maiores teores de isoquercitrina foram encontrados nas partes vegetativas após 24 horas de contato com LAP e no tratamento com LP, sendo que, nas partes reprodutivas não houve aumento do teor do metabólito. No entanto, hiperosídeo não apresentou alterações em relação às plantas controle nas partes vegetativas, porém um acúmulo do metabólito em 48 horas de tratamento com LAP e no tratamento com LP foi observado. Para o ácido clorogênico o tratamento com LP promoveu acúmulo nas partes vegetativas, enquanto que nas partes reprodutivas esse acúmulo foi observado no tratamento de 72 horas com LAP. Estudos demonstram que fungos endófitos geralmente provocam respostas mais rápidas e fortes do que patógenos, caracterizada pela produção da espécie reativa peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e elevada atividade da enzima fenilalanina amônio liase (FAL) (SCHULZ *et al.*, 1999; LAUKKANEM *et al.*, 2000), enzima chave na biossíntese de flavonóides e outros compostos fenólicos. O aumento da produção de H_2O_2 e da atividade de FAL vai de encontro com os resultados obtidos neste trabalho, com maiores teores do flavonóides hiperosídeo e isoquercitrina, reconhecidos por sua atividade antioxidante (BERNARDI *et al.*, 2007a). Deste modo, um estudo conduzido por KOSKIMAKI e colaboradores (2009) demonstrou que plantas de *Vaccinium myrtillus* elicitadas com o fungo endófito

Paraphaesosphaeria sp apresentam um perfil de acúmulo de flavonóides diferenciado em relação a plantas elicitadas com o fungo patogênico *Botrytis cinerea*.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a elicitação de plantas aclimatadas de *Hypericum polyanthemum* com o fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* provoca mudanças significativas no metabolismo do vegetal. Entre elas:

1. Aumento da biomassa em duas vezes em relação às plantas controle, sendo superior ao de experimentos onde as plantas foram submetidas à fertilização contínua, nas mesmas condições de cultivo;
2. O conteúdo de compostos fenólicos nas plantas aumentou cerca de duas vezes nas partes vegetativas, resultado que está de acordo com o maior teor dos flavonóides hiperosídeo e isoquercitrina. Cabe ressaltar que o maior teor de flavonóides pode estar relacionado ao tipo de elicitação, pois tratamentos com fungos endófitos tendem a uma maior expressão da enzima fenilalanina amônio liase (FAL), chave na biossíntese desses compostos.
3. Os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 tiveram alterações mais significativas nas partes reprodutivas da planta, principalmente no tratamento contínuo por 16 semanas com LAP;
4. O derivado de floroglucinol, uliginosina B apresentou variações no seu teor de acordo com o tratamento. O tratamento contínuo com LAP nas partes reprodutivas resultou em um aumento significativo no conteúdo do metabólito;

Apesar do aumento do teor nos metabólitos analisados não ser tão pronunciado, como em eliciações com compostos abióticos (jasmonato, ácido salicílico, etileno) e bióticos (fungos fitopatogênicos), os resultados obtidos nesse trabalho se mostram importantes por não haver sequer danos superficiais às plantas em estudo. Assim, o

sistema descrito representa uma nova abordagem em estudos com *H. polyanthemum* visando otimizar condições para a produção de biomassa e metabólitos secundários de interesse medicinal. Ainda, é importante destacar que os experimentos foram conduzidos com uma concentração fixa e definida da solução fúngica ($1,5 \times 10^6$ esporos/mL) e sendo assim, outras concentrações devem ser testadas para avaliar os possíveis efeitos benéficos visando a maior produção dos metabólitos de interesse pela planta.

6. REFERÊNCIAS

ABREU, I.N.; PORTO, A.L.M.; MARSAIOLI, A.J.; MAZZAFERA, P. Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. *Plant Science*, v. 167, p. 949-954, 2004.

ALDRIDGE, D.C.; TURNER, W.B. Structures of cytochalasin C and cytochalasin D from *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Chemical Society C*, v. 6, p. 923-928, 1969.

AKELLO, J.; DUBOIS, T.; GOLD, C.S.; COYNE, D.; NAKAVUMA, J.; PAPARU, P. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 96, p. 34-42, 2007.

ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS N.; HERRE, E.A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, p. 15649-15654, 2003.

ARNOLD, A.E.; LEWIS, L.C. Ecology and evolution of fungal endophytes, and their roles against insects. In: VEGA, F.E.; BLACKWELL, M. (Eds). *Insect-fungal Associations: Ecology and Evolution*. Oxford: Oxford University Press, 2005. p. 74-96.

ARNOLD, A.E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, v. 88, p. 541-549, 2007.

ASKARY, H.; CARRIÈRE, Y.; BÉLANGER, R.R.; BRODEUR, J. Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildew. *Biocontrol Science and Technology*, v. 8, p. 23-32, 1998.

AZUMI, M.; ISHIDOH, K-I.; KINOSHITA, H.; NIHIRA, T.; IHARA, F.; FUJITA, T.; IGARASHI, Y. Aurovertins F-H from the entomopathogen fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 278-280, 2008.

BAIS, H.P.; WALKER, T.S.; MACGREW, J.J.; VIVANCO, J.M. Factors affecting the growth of cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort) and production of hypericin. *In Vitro Growth and Development-Plant*, v. 38, p. 1-9, 2002.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v. 78, p. 431-441, 2005.

BENHAMOU, N.; BRODEUR, J. Evidence for antibiosis and induced host defense reactions in the interaction between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*, the causal agent of greenmold. *Phytopathology*, v. 90, p. 932-943, 2000.

BENHAMOU, N.; BRODEUR, J. Pre-inoculation of Ri T-DNA transformed cucumber roots with the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, induces host defense reactions against *Pythium ultimum* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 58, p. 133-146, 2001.

BENNETT, G.J.; LEE, H.H. Xanthonenes from Guttiferae. *Phytochemistry*, v. 28, p. 967-998, 1989.

BERNARDI, A.P.; FERRAZ, A.; ALBRING, D.; BORDIGNON, S.; SCHRIPSEMA, J.; BRIDI, R.; DUTRA, C.S.; HENRIQUES, A.T.; von POSER, G.L. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 784-786, 2005.

BERNARDI, A. P. M. *Análise química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas in vitro de espécies de Hypericum nativas do Rio Grande do Sul*. 2007a. 365f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007a.

BERNARDI, A.P.M.; MAURMANN, N.; RECH, S.B.; von POSER, G.L. Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt cultured *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 29, p. 165-170, 2007b.

BERNARDI, A.P.M.; NUNES, J.M.; MARCHIORO, M.K.; ROSA, L.M.G.; von POSER, G.L.; RECH, S.B. Phenolic compounds profiles during ex vitro acclimatization of micropropagated *Hypericum polyanthemum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 46, p. 694-700, 2008.

BEVER, J.D.; WESTOVER, K.M.; ANTONOVICS, J. Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. *Journal of Ecology*, v. 85, p. 561-573, 1997.

BILIA, A.R.; GALLORI, S.; VINCIERI, F.F. St. John's wort and depression, efficacy, safety and tolerability – an update. *Life Sciences*, v. 70, p. 3077-3096, 2002.

BILLS, G.F.; POLISHOOK, J.D. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. *Canadian Journal of Botany*, v. 69, p. 1477-1482, 1991.

BING, L.A., LEWIS, L.C. Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Environmental Entomology*, v. 20, p. 1207-1211, 1991.

BING, L.A., LEWIS, L. C. Temporal relationships between *Zea mays*, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and endophytic *Beauveria bassiana*. *Entomophaga*, v. 37, p. 525-536, 1992.

BRUNO, J.F.; STACHOWICZ, J.J.; BERTNESS, M.D. Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 18, p. 119-125, 2003.

BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems, and Potential*. Wallingford: Cabi Publishing, 2001. 390p.

BUTTER, B.; ORLACCHIO, C.; SOLDATI, A.; BERGES, K. Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation of *Hypericum perforatum*. *Planta Medica*, v. 64, p. 431-437, 1998.

CANTER, P.H.; THOMAS, H.; ERNST, E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. – Review. *Trends in Biotechnology*, v. 23, p.180-185, 2005.

CARDOSO, M.A.; DE OLIVEIRA, D.E. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: shoot multiplication and callus induction. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, v. 44, p. 91-94, 1996.

CAKIR, A.; KORDALI, S.; KILIC, H.; KAYA, E. Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 33, p. 245-256, 2005.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, v. 69, p. 2-9, 1988.

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R., Acclimatization of tissue culture plants: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, v. 32, p. 1199-1205, 2010.

CHEN, H.; CHEN, F.; CHIU, F.C.K.; LO, C.M.Y. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.28, p.100-105, 2001.

CIRAK, C.; AKSOY, H.M.; AYAN, A.K.; SAGLAM, B.; KEVSEGLU, K. Enhanced hypericin production in *Hypericum perforatum* and *Hypericum pruinatum* in response to inoculation with two fungal pathogens. *Plant Protect Science*, v. 41, p. 109-114, 2005.

CLAY, K. The potential role of endophytes in ecosystems. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. (Eds) *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 73–86.

CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, v.160, p. 99-127, 2002.

CONCEIÇÃO, L.F.R.; FERRERES, F.; TAVARES, R.M.; DIAS, A.C.P. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry*, v. 67, p.149-155, 2006.

CONFORTI, F.; STATTI, G.A.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; HOUGHTON, P. Antioxidant activity of metanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. *Fitoterapia*, v.73, p. 479-483, 2002.

CONRATH, U.; BECKERS, J.G.M.; FLORS, V.; GARCÍA-AUGUSTÍN, P.; JAKAB, G.; MAUCH, F. Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, v. 19, p. 1062-1071, 2006.

COUCEIRO, M.A; AFREEN, F.D.E; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAY, T. Variation in concentrations of major bioactive compounds of St. John's Wort: Effects of harvesting time, temperature and germoplasm. *Plant Science*, v. 170, p. 128-134, 2006.

COUTTS, R.T.; HINDMARSH, K.W. Mass spectra of some quinoline hydroxamic acids and related compounds. *Organic Mass Spectrometry*, v. 2, p. 681-695, 1969.

CROCKETT, S.L.; SCHANEBERG, B.; KHAN, I.A. Phytochemical profiling of new and old world *Hypericum* (St. John's Wort) species. *Phytochemical Analysis*, v. 16, p. 479-485, 2005.

CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants, *Biomedical and Life Science* (Brittonia), Nova York: Columbia University Press, 1981, v.34, 268-270.

DAI, C.C.; YU, B.Y.; LI, X. Screening of endophytic fungi that promote the growth of *Euphorbia pekinensis*. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 3505-3509, 2008.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M.; von POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, v. 10, p. 141-147, 2003.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; von POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S. Bioassay guided isolation of antimicrobial benzopyrans and phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. *Phytotherapy Research*, v. 19, p. 291-293, 2005.

DEB, C.R, IMCHEN, T. An efficient in vitro hardening of tissue culture raised plants. *Biotechnology*, v. 9, p. 79-83, 2010.

- DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds). *Micropropagation: technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 1-14.
- DEHER, K.; CALLIS, J. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Annals of Botany*, v. 99, p. 787-822, 2007.
- DÍAZ-PEREZ, J.C.; SUTTER; E.G.; SHACKEL, K.A. Acclimatization and subsequent gas-exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. *Physiologia Plantarum*, v. 95, p. 225-32, 1995.
- DMITRIEV, A.P. Signal molecules for plant defence responses to biotic stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 50, p. 417–425, 2003.
- DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Plant Pathology*, v. 42, p. 185-209, 2004.
- ELSWORTH, J.F.; GROVE, J.F. Cyclodepsipeptides from *Beauveria bassiana* Bals. Part 1. Beauverolides H and I. *Journal of Chemical Society*, p. 270-273, 1977.
- EVANS, H.C.; HOLMES, K.A., THOMAS, S.E. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest trees, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*, v. 2, p. 149–160, 2003.
- FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, v. 43, p. 237–256, 2007.
- FERRAZ, A.B.F.; BORDIGNON, S.A.L.; STAATS, C.; SCHRIPSEMA, J.; von POSER, G.L. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. *Phytochemistry*, v. 57, p. 1227-1230, 2001.
- FERRAZ, A.B.F.; SCHRIPSEMA, J.; POHLMANN, A.R.; von POSER, G.L. Uliginosin B from *Hypericum myrianthum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 30, p. 989-991, 2002a.
- FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MANS, D.R.A.; SCHMITT, A.; RAVAZZOLO, A.P.; von POSER, G.L. Screening for the presence of hypericins in southern Brazilian species of *Hypericum* (Guttiferae). *Pharmaceutical Biology*, v. 40, p. 294-297, 2002b.

FERRAZ, A.; LIMBERGER, R.; BORDIGNON, S.; von POSER, G.; HENRIQUES, A. Essential oil in composition of six *Hypericum* species from southern Brazil. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 20, p. 335-339, 2005.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (Eds.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, 2003. p.123-146.

FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, J.R. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science*, v. 260, p. 75-78, 1993.

FULLER, R.W.; WESTERGAARD, C.K.; COLLINS, J.W.; CARDELLINA II, J.H.; BOYD, M.R. Vismiaphenones D-G, new prenylated benzophenones from *Vismia cayennensis*. *Journal of Natural Products*, v. 62, p. 67-69, 1999a.

FULLER, R.W.; BLUNT, J.W.; BOSWELL, J.L.; CARDELLINA II, J.H.; BOYD, M.R. Guttiferone F, the first prenylated benzophenone from *Allanblackia stuhlmannii*. *Journal of Natural Products*, v. 62, p. 130-132, 1999b.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspensions cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, v. 50, p. 151-158, 1968.

GANLEY, R.J.; NEWCOMBE, G. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research*, v. 110, p. 318-327, 2005.

GAO, F-K.; DAI, C-C.; LIU, X-Z. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, v. 4, p. 1346-1351, 2010.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. *Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of comercial laboratories*. Eversley: Exegetics Ltd., 1984. 593p.

GNERRE, C.; von POSER, G.L.; FERRAZ, A.; VIANA, A.; TESTA, B.; RATES, S.M. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 53, p. 1273-1279, 2001.

GOELNER, K.; CONRATH, U. Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, v. 121, p. 233-242, 2008.

GOETTEL, M.S.; EILENBERG, J.; GLARE, T.R. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In: GILBERT, L.; IATROU, K.; GILL, S. (Eds), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Londres: Elsevier, 2005. p. 361-406.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p.183-260.

GRIME, J.P.; MACKEY, J.M.; HILLIER, S.H.; READ, D.J. Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. *Nature*, v. 328, p. 420–422, 1987.

GROPPE, K.; STEINGER, T.; SANDERS, I.; SCHIMID, B.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T. Interaction between the endophytic fungus *Epichloë bromicola* and the grass *Bromus erectus*: effects of endophyte infection, fungal concentration and environment on grass growth and flowering. *Molecular Ecology*, v. 8, p. 1827-1835, 1999.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 1-93, 2006.

HAAS, J. *Isolamento e avaliação biológica de compostos fenólicos em espécies de Hypericum nativas do sul do Brasil*. 2010a. 138f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010a.

HAAS, J.S.; VIANA, A. F.; HECKLER, A.P.; von POSER, G.L.; RATES, S.M.K. The antinociceptive effect of a benzopyran (HP1) isolated from *Hypericum polyanthemum* in mice hot-plate test is blocked by naloxone. *Planta Medica*, v.76, p. 1419-1423, 2010b.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMAN, K. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v. 30, p. 386-3874, 1991.

HAMILL, R.L.; HIGGINS, C.E.; BOAZ, M. E.; GORMAN, M. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Letters*, v. 10, p. 4255-4258, 1969.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J.P.; VAN LOON, L.C. Inducing Resistance: a summary of papers presented at the first international symposium on induced resistance to plant disease. *European Journal of Plant Pathology*. v. 107, p. 1-6, 2001.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, v. 8, p. 1773-1791, 1996.

HAO, G.; DU, X.; ZHAO, F. Fungal endophytes-induced abscisic acid is required for flavonoid accumulation in suspension cells of *Ginkgo biloba*. *Biotechnological Letters*, v. 32, p.305-314, 2010.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.; GENEVE, R. *Plant propagation: principles and practices*. 7.ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2002. 896 p.

HARTNETT, D.C., HETRICK, B.A.D., WILSON, G.W.T., GIBSON, D.J. Mycorrhizal influence on intra- and interspecific neighbor interactions among co-occurring prairie grasses. *Journal of Ecology*, v. 81, p. 787-795, 1993.

HARTNETT, D.C., WILSON, G.W. Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tallgrass prairie. *Ecology*, v. 80, p. 1187- 1195, 1999.

HAZARICA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, v. 85, p. 1704-171, 2003.

van der HEIJDEN, M.G.A.; KLIRONOMOS, J.N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGE, R.; BOLLER, T.; WEIMKEN, A.; SANDERS, I.R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, v. 396, p.69–72, 1998.

IGNOFFO, C.M. *Nomuraea rileyi* as microbial insecticide. In: BURGESS, H.D. (Ed.) *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*. Londres: Academic Press, 1981. p. 513-538.

JONE, W.P.; CHIN, Y.W.; KINGHORN, A.D. The Role of Pharmacognosy in Modern Medicine and Pharmacy. *Current Drug Target*, v. 7, p. 247-264, 2006.

KARTINIG, T.; GÖBEL, I.; HEIDEL, B. Production of hypericin, pseudohypericin and flavonoids in cell cultures of various *Hypericum* species and their chemotypes. *Planta Medica*, v. 62, p. 51-53, 1996.

KARWASARA, V.S.; JAIN, R.; TOMAR, P.; DIXIT, V.K. Elicitation as yield enhancement strategy for glycyrrhizin production by cell cultures of *Abrus precatorius* Linn. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v.46, p.354-362, 2010

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.1, p. 30-33, 1997.

KIM, J.J.; GOETTEL, M.S.; GILLESPIE, D.R. Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Biological Control*, v. 40, p. 327–332, 2007.

KIM, J.J.; GOETTEL, M.S.; GILLESPIE, D.R. Evaluation of *Lecanicillium longisporum*, Vertalec for simultaneous suppression of cotton aphid, *Aphis gossypii*, and cucumber

powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*, on potted cucumbers. *Biological Control*, v. 45, p. 404–409, 2008.

KIRAKOSYAN, A.; GIBSON, D.M.; SERVENT, T. A comparative study of *Hypericum perforatum* plants as sources of hypericins and hyperforins. *Journal of Herbs Species and Medicinal Plants*, v. 10, p. 79-88, 2003.

KIRAKOSYAN, A.; SERVENT, T.; GIBSON, D.M.; KAUFMAN, P.B. The production of hypericins and hyperforins by *in vitro* cultures of *Hypericum perforatum*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 39, p. 71-81, 2004.

KITANOV, G.M.; NEDIALKOV, P.T. Mangiferin and isomangiferin in some *Hypericum* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 26, p. 647-653, 1998.

KONDO, S.; MEGURIYA, N.; MOGI, H.; AOTA, T.; MIURA, K.; FUJII, T.; HAYASHI, I.; MAKINO, K.; YAMAMOTA, M.; NAKAJIMA, N. K-582, a new peptide antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, v. 33, p. 533–542, 1980.

KOORNNEEF, A.; PIETERSE, C.M.J. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology*, v. 146, p. 839-844, 2008.

KOSKIMÄKI, J.; HOKKANEN, J.; JAAKOLA, L.; SUORSA, M.; TONOLEN, A.; MATTILA, S.; PIRTILLÄ, A.M.; HOHTOLA, A. Flavonoid biosynthesis and degradation play a role in early defence responses of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against biotic stress. *European Journal of Plant Pathology*, v. 125, p. 629-640, 2009.

KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, 2003. p. 539-540.

LA BANCA, E.R.G. *Purificação parcial de elicitores presentes em Saccharomyces cerevisiae: atividade como indutores de resistência em pepino (Cucumis sativum) contra Colletotrichum lagenarium e da síntese de gliceolinas em soja (Glycine max)*. 2002, 107f. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2002.

LAUKKANEN, H.; SOINI, H.; KONTUNEN-SOPPELA, S.; HOHTOLA, A.; VILJANEN, M. (2000). A mycobacterium isolated from tissue cultures of mature *Pinus sylvestris* interferes with growth of Scots pine seedlings. *Tree Physiology*, v. 20, p. 915-920, 2005.

LAWVERE, S.; MAHONEY, M.C. St. John's Wort. *American Family Physician*, v. 72, p. 2249-2254, 2005.

LEWIS, G.C. Effects of biotic and abiotic stress on the growth of three genotypes of *Lolium perenne* with and without infection by the fungal endophyte *Neotyphodium lolii*. *Annals of Applied Biology*, v. 144, p. 53-63, 2004.

MACLEOD, D.M. Investigations of the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. *Canadian Journal of Botany*, v. 32, p. 818-893, 1954.

MALINOWSKI, D.P.; ZUO, H.; BELESKY, D.P.; ALLOUSH, G.A. Evidence for copper binding by extracellular root exudates of tall fescue but not perennial ryegrass infected with *Neotyphodium* spp. endophytes. *Plant Soil*, v. 267, p. 1-12, 2004.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. Técnicas de cultura de tecidos. In: MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R.A. (Orgs.) *Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução a engenharia genética em plantas*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p.101-181.

MARON, J.L.; CONNORS, P.G. A native nitrogen-fixing shrub facilitates weed invasion. *Oecologia*, v. 105, p. 302-312, 1996.

MATHUR, A., MATHUR, A. K., VERMA, P. Biological hardening and genetic fidelity testing of micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivillianum*. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 1046–1053, 2008.

MCLUSKY, S.; BENNETT, M.; NEALE, M.; LEWIS, M.; GASKIN, P.; MANSFIELD, J. Cell wall alteration and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxydase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal*, v. 17, p. 523-534, 1999.

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. *Physiology Plant*, v.15, p. 473-497, 1962.

MURCH, S.P.; RUPASINGHE, H.P.V.; SAXENA, P.K. An *in vitro* and hydroponic growing system for hypericin, pseudohypericin, and hyperforin production of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv New Stem). *Planta Medica*, v. 68, p. 1108–1112, 2002.

MURCH, S.P.; SAXENA, P.K., St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): challenges and strategies for production of chemically-consistent plants. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 86, p. 765-771, 2006.

NGE, K.L.; NEW, N.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W.F. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Science*, v. 170, p. 1185-1190, 2006.

NÖR, C.; ALBRING, D.; FERRAZ, A.B.F.; SCHRIPSEMA, J.; PIRES, V.; SONNET, P.; GUILLAUME, D.; von POSER, G.L. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the *Trigynobrathys* section. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, p. 517-519, 2004.

NÖR, C.; BERNARDI, A.P.; HASS, J.; SCHRIPSEMA, J.; RECH, S.; von POSER, G. Phenolic constituents of *Hypericum* flowers. *Natural Product Communications*, v. 3, p. 237-240, 2008.

NIKLAS, C.O. Perspectivas de micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). *Citrusmisiones*, n. 12, p. 11-14, 1986.

NUNES, J.M.; PINHATTI, A.V.; ROSA, L.M.G.; von POSER, G.L.; RECH, S.B. Roles of *in vitro* plantlet age and growing period in the phenolic constituent yields of acclimatized *Hypericum polyanthemum*. *Environmental and Experimental Botany*, v. 67, p. 204–208, 2009a.

NUNES, J.M.; PINHATTI, A.V.; von POSER, G.L.; RECH, S.B. Promotive effects of long time fertilization on growth of tissue culture-derived *Hypericum polyanthemum* plants during acclimatization. *Industrial Crops and Products*, v. 30, p. 329–332, 2009b.

NUNES, J.; PINTO, P.; BORDIGNON, S.; RECH, S.; von POSER, G. L. Phenolic compounds in *Hypericum* species of *Trigynobrathys* section. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 38, p. 224-228, 2010.

OWNLEY, B.H.; PEREIRA, R.M.; KLINGEMAN, W.E.; QUIGLEY, N.B.; LECKIE, B. M. *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens. In: LARTEY, R.T.; CAESAR, A.J. (Eds). *Emerging Concepts in Plant Health Management*. India: Research Signpost, 2004. p. 255–269.

OWNLEY, B.H.; WINDHAM, M. Biological control of plant pathogens. In: TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M.T.; WINDHAM, A.S. (Eds). *Plant Pathology: Concepts and Laboratory Exercises*. Boca Rotan: CRC Press, 2007. p. 423–436.

OWNLEY, B.H.; DEE, M.M.; GWINN, K.D. Effect of conidial seed treatment rate of entomopathogenic *Beauveria bassiana* 11-98 on endophytic colonization of tomato seedlings and control of Rhizoctonia disease. *Phytopathology*, v. 98, S118, 2008a.

OWNLEY, B.H.; GRIFFIN, M.R.; KLINGEMAN, W.E.; GWINN, K.D.; MOULTON, J. K.; PEREIRA, R.M. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 98, p. 267–270, 2008b.

PAIS, M.; DAS, B.C.; FERRON, P.P. Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry*, v. 20, p. 715–723, 1981.

PAIVA, R.; OLIVEIRA, L.M. *Fisiologia e produção vegetal*. Lavras/MG: UFLA, 2006. 104 p.

PEDROTTI, E.L.; VOLTOLINI, J.A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira M9. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 23, p. 234-239, 2001.

PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; VAN WESS, S.C.M.; TON, J.; VERHAGEN, B. W.M.; LEÓN-KLOOTERZIEL, K.; HASE, S.; DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V.; POZO, M.; SPOEL, S.; VAN DER ENT, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFÚN-JUNIOR, A.; RESENDE, M.L.V; VAN LOON, L.C. Indução de resistência sistemática por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. *Revisão anual de patologia de plantas*, v. 13, p. 277-295, 2005.

POSADA, F.; AIME, M.C.; PETERSON, S.W.; REHNER, S.A.; VEGA, F.E. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycological Research*, v. 111, p. 748–757, 2007.

POSPISILOVA, J.; TICHA, I.; KADLECEK, P. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Plant Biology*, v. 42, p. 481–497, 1999.

POUTARAUD, A.; GIRARDIN, P. Improvement of medicinal plant quality: a *Hypericum perforatum* literature review as an example. *Plant Genetic Resources*, v. 3, p. 178-189, 2005.

PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds) *Micropropagation, Technology and applications*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 71–93.

QUESADA-MORAGA, E.; LANDA, B.B.; MUNOZ-LEDESMA, J.; JIMENEZ- DIAZ, R. M.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Endophytic colonization of opium poppy *Papaver somniferum* by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathology*, v. 161, p. 323–329, 2006.

RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell culture:chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v. 20, p. 101-153, 2002.

REINERT, J.; YEOMAN, M.M. *Plant cell tissue culture- a Laboratory manual*. Berlin: Springer-Verlag, 1982. 83 p.

ROBERTS, D.W.; HUMBER, R.A. Entomogenous fungi. In: COLE, G.T.; KENDRICK, B. (Eds). *Biology of Conidial Fungi*. Nova York: Academic Press, 1981. p. 201–236.

ROBSON, N.K.B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 1. Infrageneric classification. *Bulletin of the British Museum (Natural History) - Botany Series* 5, p. 293-355, 1977.

ROBSON, N.K.B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 2. Characters of the genus. *Bulletin of the British Museum (Natural History) - Botany Series* 8, p. 55-226, 1981.

ROBSON, N.K.B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 8. Sections 29. Brathys (Part 2) and 30. Trigynobrathys. *Bulletin of the British Museum (Natural History) - Botany Series* 20, p. 1-151, 1990.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; KAPLAN, M.; STOECKLIEVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTMANN, K., An antifungal c-pyrone and xantones with monoamine oxidadase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v. 36, p. 1381-1385, 1994.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M. A. C.; STOECKLIEVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTMANN, K. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v. 40, p. 1447-1452, 1995.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M.A.C.; HOSTETTMAN, K. More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v.42, p. 185-188, 1996.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 91-120, 2000.

RUDGERS, J.A.; HOLAH, J.; ORR, S.P.; CLAY, K. Forest succession suppressed by an introduced plant-fungal symbiosis. *Ecology*, v. 88, p.18–25, 2007.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, v. 29, p. 319-343, 1998.

SAIKKONEN, K.; LEHTONEN, P.; HELANDER, M.; KORICHEVA, J.; FAETH, S.H. Model systems in ecology: dissecting the endophytegrass literature. *Trends in Plant Science*, v. 11, p. 428–433, 2006.

SCHMITT, A.C.; RAVAZZOLO, A.P.; von POSER, G.L. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, p. 239-245, 2001.

SCHULZ, B.; RÖMMERT, A.-K.; DAMMANN, U.; AUST, H.-J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research*, v. 103, p. 1275–1283, 1999.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. *Mycological Research*, v. 109, p. 661–686, 2005.

SILVA, R.A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. *Documentos/Embrapa Agrobiologia*. ISSN: 1517-8498, 2008. p.1-49.

SIRVENT, T.; GIBSON, D. Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.60, p. 311-320, 2002.

SHEWRY, P.R.; LUCAS, J.A. Plants proteins that confers resistance to pests and pathogens. *Advances in Botanical Research- Incorporating Advances in Plant Pathology*, v. 26, p. 135-192, 1997.

STACHOWICZ, J.J. Mutualism, facilitation, and the structure of ecological communities. *Bioscience*, v. 51, p. 235–246, 2001.

STADNIK, M. Indução de resistência a oídeos. In: *XXIII Congresso Paulista de Fitopatologia*, n.23, 2000, Campinas. Anais. Campinas: GPF, 2000. p. 176-181.

STICHER, L.; MAUCHI MANI, B.; MÉTRAUX, J. Systematic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 35, p. 235-270, 1997.

STOLZ, E. *Avaliação da atividade antinociceptiva de uliginosina B, um floroglucinol isolado de espécies de Hypericum nativas do Rio Grande do Sul*. 2011. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Neurociências) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SUJII, R.E.; TIGANO, M.S.; SOSA-GOMES, D. Simulação do impacto do fungo *Nomuraea rileyi* em populações de lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, p. 1551-1558, 2002.

SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from in vitro culture. *Journal of American Society for Horticultural Science*, v. 113, p. 234-8, 1988.

SUZUKI, A.; KANAOKA, M.; ISOGAI, A.; MURAKOSHI, S.; ICHINOE, M.; TAMURA, S. Bassinolide - a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecani*. *Tetrahedron Letters*, v. 25, p. 2167-2217, 1977.

TANAKA, A.; TAPPER, B.A.; POPAY, A.; PARKER, E.J.; SCOTT, B. A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. *Molecular Microbiology*, v. 57, p.1036-1050, 2005.

TERMIGNONI, R.R. *Cultura de tecidos vegetais*. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2005. 182 p.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRIGIDO, M.M.; ROMANO, E. *Glossário de Biotecnologia Vegetal*. Brasília: Emprapa Hortaliças, 2000. 128 p.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 55, p. 85-97, 1999.

VANTELGEN, H. J.; VANMIL, A.; KUNNEMAN, B. Effect of propagation and rooting condition on acclimatization of micropropagated plants. *Acta Botanica Neerlandica*, v. 41, p. 453-9, 1992.

VEGA, F.E. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 98, p. 277-279, 2008.

VEGA, F.E.; POSADA, F.; AIME, M.C.; PAVA-RIPOLL, M.; INFANTE, F.; REHNER, S.A. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*, v. 46, p.72-82, 2008.

VEGA, F.E.; GOETTEL, M.S.; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D.; JACKSON, M. A.; KELLER, S.; KOIKE, M.; MANIANIA, M.; MONZÓN, A.; OWNLEY, B.H.; PELL, J.K.; RANGEL, D.; ROY, H.E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, v.2, p. 149-159, 2009.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Development Today*, v.3, p.232-238, 1998.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the New Millennium: Leadfinding and Biotechnology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 52, p. 253-262, 2000.

VEROTTA, L.; APPENDINO, G.; BELLORO, E.; JAKUPOVIC, J.; BOMBARDELLI, E. Furohyperforin, a prenylated phloroglucinol from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Journal of Natural Products*, v. 62, p. 770-772, 1999.

VINCENT, C.; GOETTEL, M.S.; LAZAROVITS, G. (Eds). *Biological Control: a Global Perspective*. Wallingford: CAB International/AAFC, 2007. 432 p.

ZHAO, J.; DAVIS, L.C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biothechnology Advances*, v.23, p. 283-333, 2005.

ZOBAYED, S.M.A.; SAXENA, P.K. *In vitro* grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. Jonh's Wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem) in a temporary immersion biorreactor. *Plant Science*, v. 165, p. 463-470, 2003.

ZOBAYED, S.M.A.; MURCH, S.J.; RUPASINGHE, H.P.V.; SAXENA, P.K. *In vitro* production and characterization of St. Jonh's Worth (*Hypericum perforatum* L. Cv New Stem). *Plant Science*, v. 166, p. 333-340, 2004.

WAGNER, B.L.; LEWIS, L.C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Environmtal Microbiology*, v. 66, p. 3468-3473, 2000.

WAINWRIGHT, H.; SCRACE. J. Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vivo* establishment. *Scientiai Horticultuae*, v.38, p. 261-266, 1989.

WALKER, T.S.; BAIS, H.P.; VIVANCO, J.M. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry*, v. 60, p. 289-293, 2002.

WALTERS, R.G. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, p. 411-435, 2005.

WARD, E.R.; UKNES, S.J.; WILLIAMS, S.C.; DINCHER, S.S.; WIEDERHOLD, D. L.; ALEXANDER, D.C.; AHL GOY, P.; MÉTRAUX, J-P.; RYALS, J.A. Coordinated gene

activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, v. 3, p. 1085-1094, 1991.

WARDLE, D.A. *Communities and ecosystems: linking the above-ground and below-ground components*. Princeton: Princeton University Press, 2002. 392 p.

WASTI, S.S; HARTMANN, G.C. Host-parasite, Interactions between larvae of gypsy moth *Lymantria dispar* (L.) (Lepdoptera: Lymantridae) and the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) SAMSON (Moniliales: moniliaceae). *Applied and Entomological Zoology*, v. 13, p. 23-28, 1978.

WIT, D.J.G.M. Visions & Reflections (minireview). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 64, p. 2726-2732, 2007.

WILKINSON, H.H.; SIEGEL, M.R.; BLANKENSHIP, J.D.; MALLORY, A.C.; BUSH L.P.; SCHARDL, C.L. Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.13, p. 1027-1033, 2000.

WU, Q.L.; WANG, S.P.; DU, L.J.; ZHANG, S.M.; YABG, J.S.; XIAO, P.G. Chromene glycosides and flavonoids from *Hypericum japonicum*. *Phytochemistry*, v. 49, p. 1417-1420, 1998.

WU, Y.; ZHOU, S.D.; LI, P. Determination of flavonoids in *Hypericum perforatum* by HPLC analysis. *Yao Xue Xue Bao*, v. 37, p. 280-282, 2002.