

Avaliação histoquímica de espécies de microplantas hospedeiras de endófitos

Histochemical evaluation of endophytes hosts microplants species

Natalia Pimentel Esposito-Polesi^{1,3}; Cristina V. Almeida²; Marcílio Almeida¹

¹ Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), Campus Piracicaba.

² *In Vitro* Palm Consultoria, Estudo e Desenvolvimento Biológico Ltda, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

³ Autor para Correspondência (*Author for correspondence*): natalia.polesi@yahoo.com.br

RESUMO

A avaliação histoquímica é uma técnica que permite identificar de maneira direta a produção de diversos compostos pela planta, muitos desses compostos podem ser utilizados em fármacos. Além disso, estudos tem mostrado que muitos endófitos encontrados em plantas cultivadas *in vitro* são fontes espontâneas de produtos naturais de interesse farmacológico. Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar histoquimicamente diferentes espécies vegetais cultivadas *in vitro*, para verificar a presença de metabólitos produzidos ou estimulados a produção pela presença de microrganismos endofíticos. Para tal, foram realizados testes histoquímicos de colorações específicas segundo o componente celular a ser identificado (amido, lipídeo e compostos fenólicos). Os resultados permitiram obter uma variedade de respostas inerentes às diferentes espécies ou estágios de desenvolvimento *in vitro*, porém nenhum deles pode ser diretamente relacionado a um determinado microrganismo endofítico, o que permite concluir que a complexidade das relações, microrganismo/planta ou endófito/hospedeiro, envolve um processo de co-evolução, no qual dificulta sobremaneira identificar o verdadeiro responsável pelo metabolismo ou produção compostos, havendo a necessidade de estudos mais aprofundados e de cunho molecular que possam fornecer subsídios para o entendimento de tais questionamentos.

Palavras-chave: endofíticos, cultivo *in vitro*, teste histoquímico, interesse farmacológico.

ABSTRACT

The histochemical evaluation is a technique that allows a direct identification of the production of various compounds by the plant, many of these compounds can be used in pharmaceuticals. Furthermore, studies have shown that many endophytes found in plants grown *in vitro* are spontaneous sources of natural products of pharmacological interest. Thus, the present study evaluated histochemically different plant species grown *in vitro* for the presence of metabolites produced or stimulated to be produced by the presence of endophytes. To this end, histochemical tests were made according to the each specific staining of cellular component to be identified (starch, lipid and phenolic compounds). The results led to a variety of responses inherent to the different species or stages of development *in vitro*, but none of them can be directly related to a particular microorganism endophytic, which shows that the complexity of relationships, microorganism/plant or endophyte/host involve a process of co-evolution, which makes it difficult to identify the true responsible for the metabolism or by producing compounds, there is a need for further studies and molecular imprint that can aid in the understanding of such questions.

Keywords: endophytic, *in vitro* culture, histochemistry tests, pharmacological interest.

INTRODUÇÃO

As células vegetais podem produzir diferentes tipos de substâncias que são de grande valor taxonômico e filogenético em vários grupos de plantas. Muitos desses compostos, como antocianina, carotenóides e óleos essenciais podem influenciar na polinização, na dispersão de frutos e sementes e na simbiose radicular com bactérias, enquanto outros compostos apresentam função de suporte estrutural para as plantas, como as ligninas, ou ainda como indicativos de estresses bióticos e abióticos (MARTINS et al., 1994; KIKUCHI et al., 2007; SANTOS et al., 2009; PIOTTO, 2013).

Os métodos histoquímicos baseiam-se em reações cromáticas utilizadas no reconhecimento da natureza química das membranas e conteúdo celular (COSTA;

CUNHA, 2000). São métodos de análise qualitativa e quantitativa de todos os componentes celulares, incluindo proteínas, carboidratos, lipídeos e elementos iônicos que ocorrem no meio celular (GERSBACH, 2002).

A técnica histoquímica permite a identificação botânica de compostos e está baseada no uso de reagentes químico-histológicos previamente estabelecidos, que permitem a localização microquímica dos princípios farmacologicamente ativos (COSTA; CUNHA, 2000). Neste contexto, cabe destacar que a presença de uma microbiota endofítica em espécies vegetais, pode ser uma fonte relativamente espontânea e potencial de produtos naturais para exploração de fármacos (LIN et al., 2007; GUO et al., 2008), sendo que muitos desses microrganismos são capazes

de sintetizar compostos bioativos usados pelas plantas para defesa contra patógenos e algumas destas combinações se mostram de grande utilidade para a descoberta de drogas modernas (GUO et al., 2008).

A presença de endófitos em plantas é frequentemente assintomática e por essa razão eles são caracterizados como sendo microrganismos que habitam o interior dos tecidos e células vegetais em parte ou em todo o seu ciclo de vida sem lhes causar danos (AZEVEDO et al., 2000; GOND et al., 2007; SAIKKONEN, 2007; GUO et al., 2008; SUN et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009). A possível onipresença desses microrganismos nos vegetais tem sido exaustivamente investigada e inúmeros estudos revelam sua potencial utilização como produtor de antibióticos e outros metabólitos de interesse farmacológico (GUO et al., 2008). Indubitavelmente uma das descobertas mais importantes com endofíticos foi o isolamento do fungo *Taxomyces andreanae* produtor de taxol, diterpenóide caracterizado como droga anticancerígena potente (GUO et al., 2008; GANGADEVI; MUTHUMARY, 2008).

A busca por compostos de interesse farmacológico tem aumentado, exigindo o aprimoramento de diversas técnicas para esse fim. Neste contexto, a análise histoquímica dos tecidos vegetais, permite detectar a presença de diversos compostos que podem ser

quantificados em função da intensidade observada por meio da microscopia de luz (SANTOS et al., 2009), se configurando como uma técnica direta, rápida, que pode fornecer indícios da presença de compostos terapêuticos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a partir de análises histoquímicas a presença de metabólitos produzidos ou estimulados pela presença de microrganismos endofíticos em diferentes espécies vegetais micropropagadas, de modo a observar como atuam, dependendo do genótipo a que estão associados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 12 espécies de plantas (Tabela 1) cultivadas em frascos, contendo 30 mL de meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 3% (w/v) de sacarose, mantidas em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura (25 ± 2°C), intensidade luminosa (42 μmol.m⁻²s⁻¹ de densidade de fluxo de fótons), fotoperíodo (16 horas) e subcultivadas em intervalos de 30 dias, para renovação do meio de cultura, por um ano.

Cabe ressaltar que as microplantas utilizadas no presente trabalho foram previamente avaliadas por meio de análises ultraestruturais, comprovando-se a presença, em todas, de endófitos colonizando o interior de seus tecidos, como mostra a Figura 1.

Tabela 1: Relação das microplantas utilizadas no presente trabalho, contendo os nomes comuns, científicos e as famílias aos quais pertencem.

Nome comum	Nome Científico	Família Botânica
abacaxi pérola	<i>Ananas comosus</i> L. Merrill	Bromeliaceae
cana-de-açúcar	<i>Saccharum officinarum</i> L.	Poaceae
cúrcuma	<i>Curcuma zedoaria</i> (Berg.) Rosc.	Zingiberaceae
eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill	Myrtaceae
manjeriço	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae
mogno	<i>Swietenia macrophylla</i> King.	Meliaceae
orquídea	<i>Oncidium flexuosum</i> Sims	Orchidaceae
pinheiro	<i>Pinus taeda</i> L.	Pinaceae
pupunha	<i>Bactris gasipaes</i> Kunth.	Palmae
sequóia	<i>Sequoia sempervirens</i> (D. Don) Endl.)	Cupressaceae
teca	<i>Tectona grandis</i> Linn. f.	Verbenaceae
violeta	<i>Viola odorata</i> L.	Violaceae

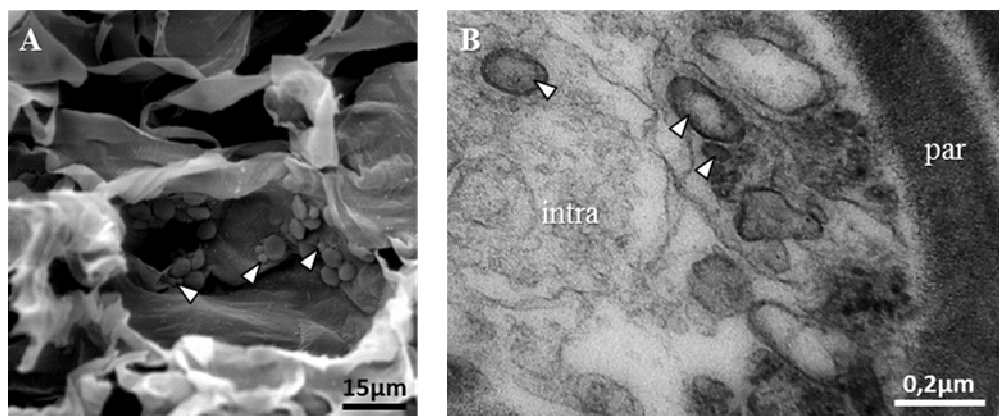


Figura 1 – Confirmação da presença de microrganismos endofíticos colonizando os tecidos das microplantas. A: fotomicrografia eletrônica de varredura evidenciando a presença de células bacterianas que colonizam as células do mesofilo da lâmina foliar de violeta, por exemplo (setas). B: fotomicrografia eletrônica de transmissão de células do mesofilo da lâmina foliar de violeta, detalhando a colonização intracelular das bactérias endofíticas (setas), onde par = parede celular e intra = espaço intracelular.

A razão para a escolha dessas espécies (em número e diversidade) consiste na tentativa em se contemplar um maior número resultados, devido ao fato de que cada uma delas possui diferentes características genéticas, anatômicas e fisiológicas capazes de fornecer respostas metabólicas específicas em decorrência da presença de endófitos.

Para tanto foram realizados testes histoquímicos de colorações específicas segundo o componente celular a ser identificado. Dentre os componentes, os avaliados foram: amido, lipídeos e compostos fenólicos, devido a sua rapidez e eficiência na interpretação de alterações metabólicas nas plantas, especialmente os compostos fenólicos que servem como indicadores de processos de defesa e estresses.

Cortes a fresco (de material não emblocado), de cada uma das espécies, foram realizados, utilizando-se o terço mediano das lâminas foliares (região madura e metabolicamente

ativa, capaz de indicar alterações), retiradas do primeiro nó completamente expandido.

Para a caracterização de lipídeos utilizou-se Sudan Black B (PEARSE, 1968), para a evidenciação de amido o reagente de Lugol (BERLYN; MIKSCHE, 1976), e para a identificação de compostos fenólicos a solução aquosa de cloreto férrico (JOHANSEN, 1940). Após a coloração, os materiais foram montados em lâminas semi-permanentes (5 lâminas para cada componente e espécie, totalizando 15 lâminas avaliadas por microplanta) e fotomicrografados, atribuindo-se o critério de avaliação segundo os parâmetros: ausência (-) ou presença (+) das substâncias e, quantitativamente, classificados como pouco presente (+), moderadamente presente (++) ou intensamente presente (+++), de acordo com a intensidade das respostas aos testes aplicados, destacando-se que simultaneamente aos testes foram realizadas secções-controle, ou seja, sem nenhum tipo de coloração. O esquema das análises pode ser visualizado na Figura 2.

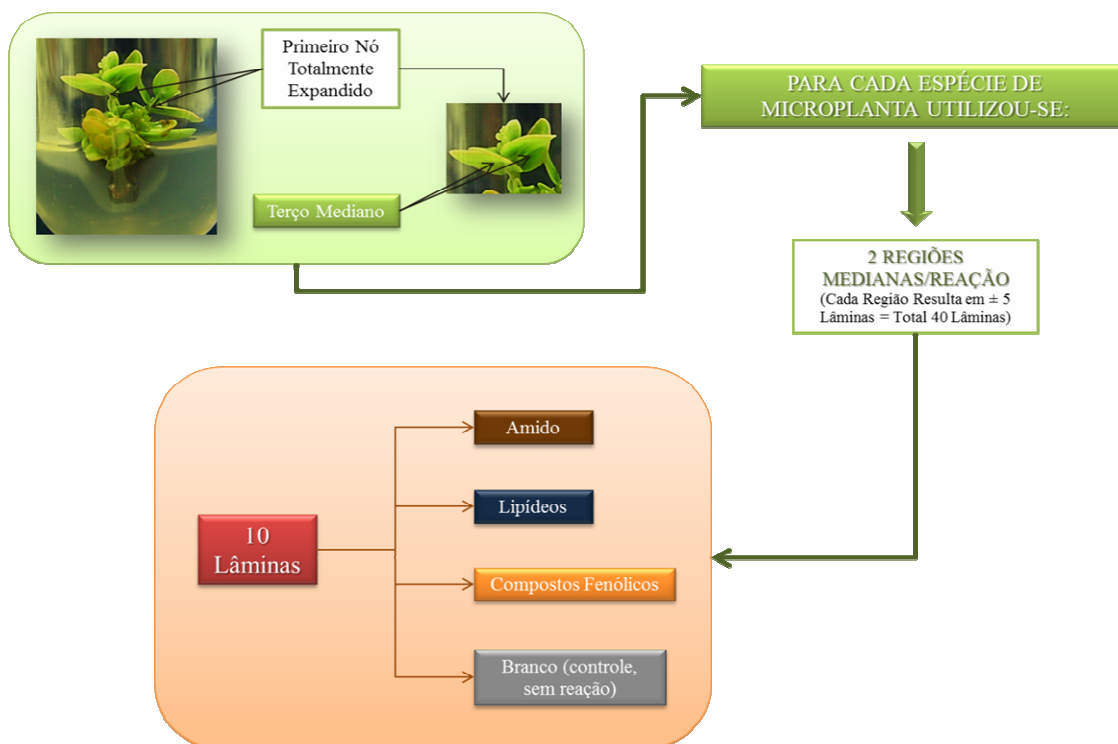


Figura 2 – Esquema da metodologia utilizada para a realização dos testes histoquímicos, bem como o tipo de amostra e a quantidade utilizada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização histoquímica das 12 espécies de microplantas evidenciou uma grande

variedade de respostas, como pode ser verificado na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização histoquímica de amido, lipídeo e compostos fenólicos, nas microplantas avaliadas.

Espécies	Amido	Lipídeo	Compostos Fenólicos
<i>Ananas comosus</i> L. Merril	-	+++	++
<i>Saccharum officinarum</i> L.	-	++	++
<i>Curcuma zedoaria</i> (Berg.) Rosc.	-	+++	+
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill	-	+	++
<i>Ocimum basilicum</i> L.	-	+++	+
<i>Swietenia macrophylla</i> King.	+	++	-
<i>Oncidium flexuosum</i> Sims	-	+++	++
<i>Pinus taeda</i> L.	-	+++	+++
<i>Bactris gasipaes</i> Kunth.	-	+++	++
<i>Sequoia sempervirens</i> (D. Don) Endl.)	-	+++	+++
<i>Tectona grandis</i> Linn. f.	-	+	+
<i>Viola odorata</i> L.	-	+++	++

Nota: Os sinais (-) ou (+) representam respectivamente ausência ou presença das substâncias e, quantitativamente, classificados como pouco presente (+), moderadamente presente (++) ou intensamente presente (+++), de acordo com a intensidade das respostas aos testes aplicados.

Em todas as microplantas estudadas (Figura 3), exceto o mogno (Figura 3A), foi possível observar em maior ou menor intensidade a

presença de compostos fenólicos, na forma de pequenas pontuações marrom escuro (setas), em todo o mesofilo, sobre as células do

parênquima (Figuras 3C, 3D, 3E, 3G, 3H, 3J, 3K e 3L), ou ainda nas células da bainha do feixe vascular de algumas microplantas como é o caso da cana-de-açúcar (Figura 3B) e por fim, nas células epidérmicas para as microplantas de cúrcuma e manjeriço.

Os compostos fenólicos se constituem em histoquímica como os fenóis simples, os orto-

di-hidroxifenóis, os flavonóides e agliconas flavônicas, taninos e ligninas (ASCENSÃO, 2003). Tais compostos são metabólitos secundários provenientes da rota do ácido chiquímico ou da rota do ácido mevalônico (KUKLINSKI, 2000; CUNHA; ROQUE, 2005; NASCIMENTO-SILVA et al, 2008).

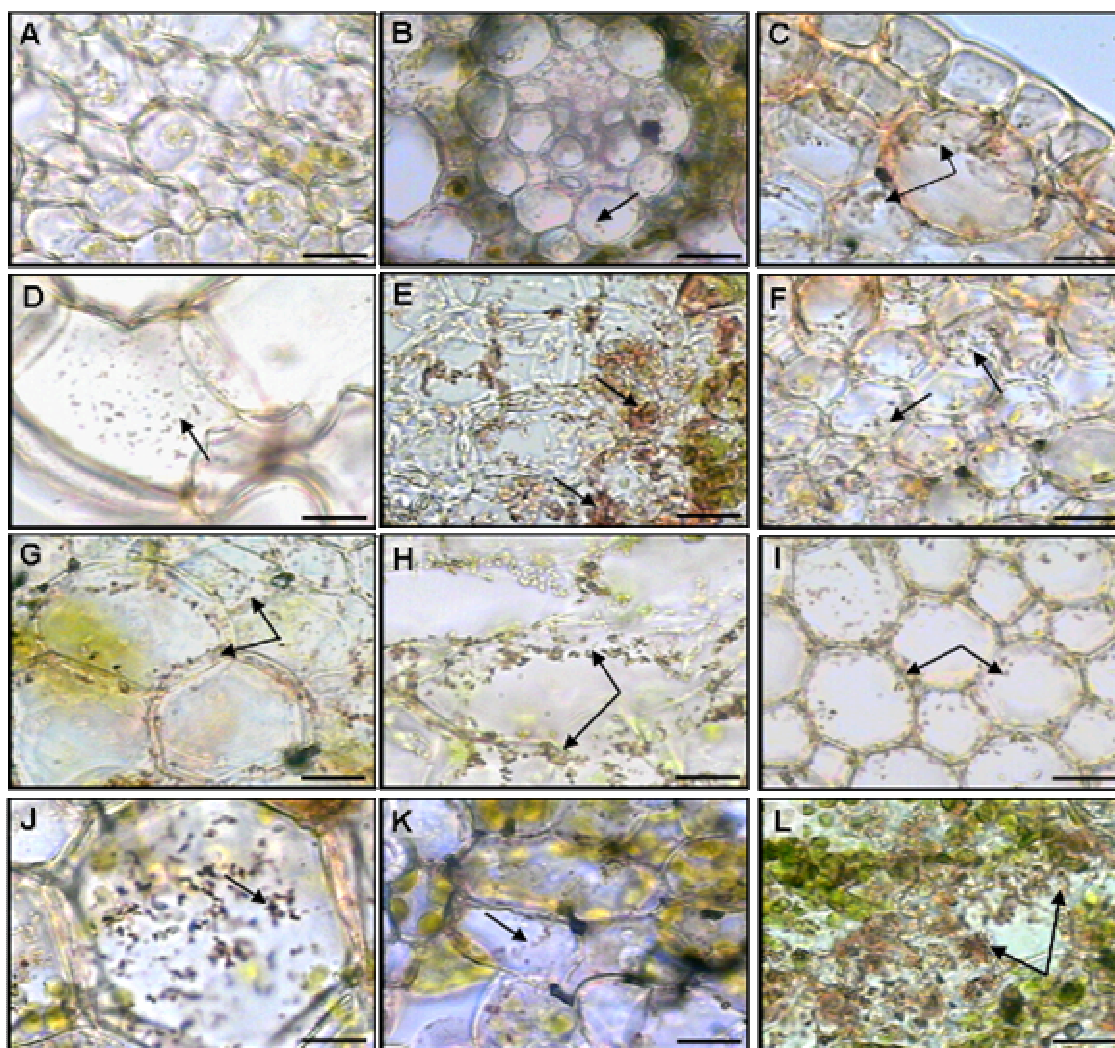


Figura 3 – Reação de compostos fenólicos em secções transversais do terço médio da lâmina foliar das microplantas. **A:** *Swietenia macrophylla* King. **B:** *Saccharum officinarum* L. **C:** *Ocimum basilicum* L. **D:** *Curcuma zedoaria* (Berg.) Rosc. **E:** *Pinus taeda* L. **F:** *Eucalyptus globulus* Labill. **G:** *Ananas comosus* L. Merril. **H:** *Oncidium flexuosum* Sims. **I:** *Tectona grandis* Linn. f. **J:** *Viola odorata* L. **K:** *Bactris gasipaes* Kunth. **L:** *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl.). Sendo A reação negativa e demais reação positiva na forma de pontuações marrom escuro (setas) em células da bainha do feixe vascular (B), células da epiderme (C e D) e células do mesofilo (E, F, G, H, I, J, K e L). Barra = 20µm.

A presença desses compostos pode auxiliar a planta de diversas formas, como suporte mecânico, atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos, contra herbivoria, ataque

de patógenos, ação alelopática, simbiose radicular com bactérias e ainda, na proteção contra radiação UV (CROTEAU et al., 2000; TAIZ; ZEIGER, 2004; SANTOS et al., 2009).

Segundo Piotto (2013) alguns compostos fenólicos são amplamente utilizados como sinalizadores de estresses e alta taxa metabólica, dessa forma a sua ausência pode indicar baixa atividade metabólica. De acordo com a mesma autora houve diferenças nas concentrações (presença ou ausência) destes compostos dependendo da fase de desenvolvimento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. Sendo assim, o resultado encontrado no presente trabalho para microplantas de mogno pode indicar baixa atividade metabólica, decorrente, possivelmente, estabilização da multiplicação celular, ou ainda, pode representar uma microbiota endofítica diferente das demais microplantas, uma vez que muitas espécies endofíticas interferem nessa produção.

Há indícios de que os endófitos podem atuar no sistema de defesa da planta, contribuindo para uma mudança estrutural na célula que envolve, entre outras coisas, a mudança da parede celular com deposição de polissacarídeos como a calose, e a infiltração de compostos fenólicos que contribuem com a compactação dos polissacarídeos da matriz celular, e quando formados nos espaços intercelulares da célula hospedeira podem restringir o crescimento de fungo, criando um ambiente fungistático (BENHAMOU et al., 1998; MADHAIYAN et al., 2004; TROTEL-AZIZ et al., 2008). Tal característica de defesa tem sido verificada em diversos estudos e explorada como um potencial uso para controle biológico de diversos fitopatógenos,

demonstrando o importante papel que os endófitos podem desempenhar nas plantas, e por analogia, esses metabólitos podem, da mesma forma, ser empregados como fármacos em diversas situações.

No homem os compostos fenólicos possuem grande importância devido à sua atividade antioxidante, que tem como função combater os radicais livres e manter o equilíbrio oxidativo do organismo, prevenindo contra câncer, diabetes, aterosclerose, doenças cardiovasculares e envelhecimento. Dentre os compostos fenólicos com reconhecida atividade antioxidante, destacam-se os flavonóides, taninos, chalconas, cumarinas e os ácidos fenólicos (GIADA; MANCINI FILHO, 2006; MARTÍNEZ-VALVERDE et al., 2000).

Em relação à reação histoquímica para lipídeos, as respostas foram todas positivas (Figura 4) na forma de pontuações e contornos que variam de azul escuro a preto nas paredes das células de todos os tecidos do mesofilo (Figuras 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4G, 4H, 4J, 4K e 4L) e azul mais claro nas células de ambas as epidermes (Figura 4I) e cutícula (Figura 4F), variando de uma espécie para outra somente na intensidade da reação. Para as microplantas de eucalipto e teca a reação se deu com mais intensidade nas células de ambas as epidermes e na cutícula, havendo uma reação menos expressiva nas células do mesofilo, já nas demais espécies essa reação foi oposta, sendo mais intensa justamente no mesofilo.

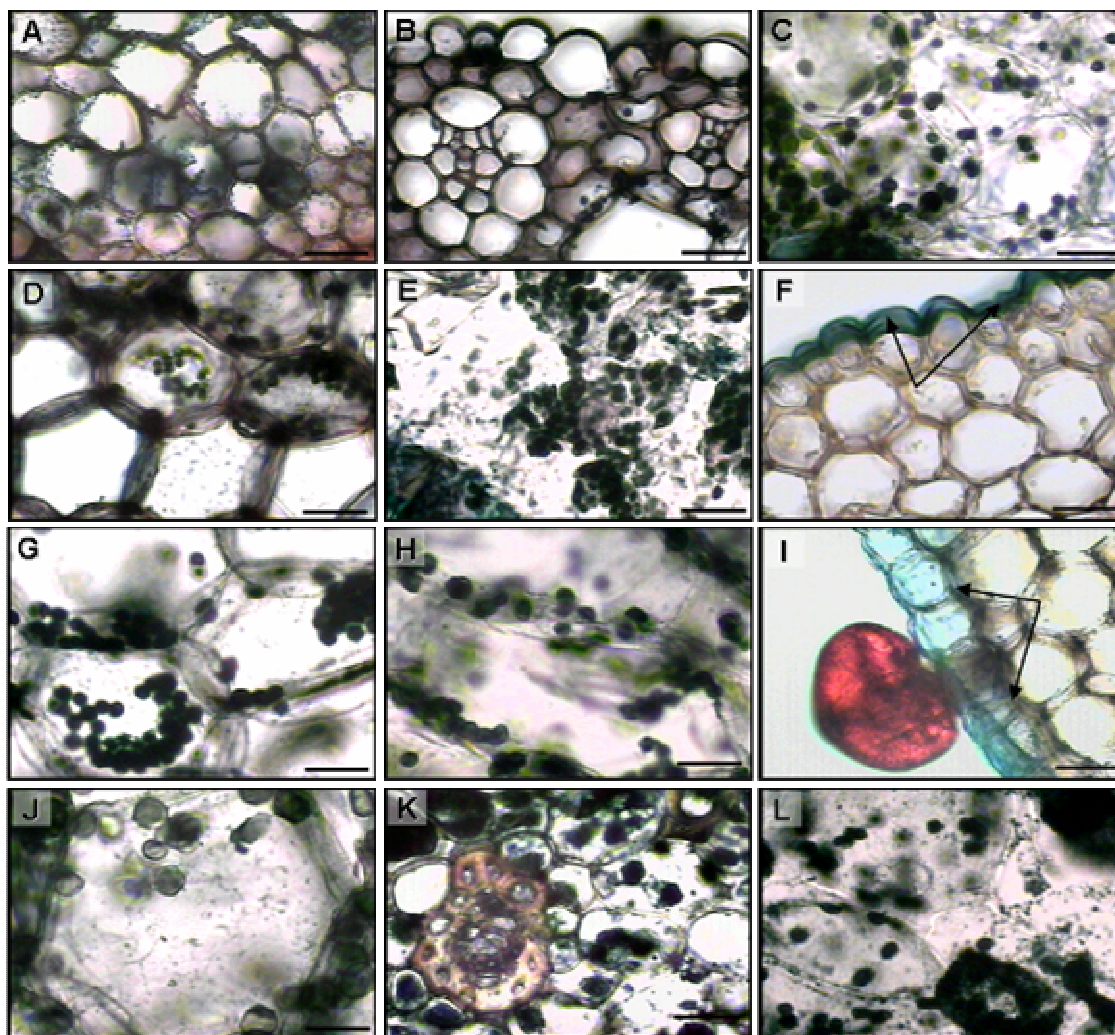


Figura 4 – Reação de lipídeos em secções transversais do terço médio da lâmina foliar das microplantas. **A:** *Swietenia macrophylla* King. **B:** *Saccharum officinarum* L. **C:** *Ocimum basilicum* L. **D:** *Curcuma zedoaria* (Berg.) Rosc. **E:** *Pinus taeda* L. **F:** *Eucalyptus globulus* Labill. **G:** *Ananas comosus* L. Merril. **H:** *Oncidium flexuosum* Sims. **I:** *Tectona grandis* Linn. f. **J:** *Viola odorata* L. **K:** *Bactris gasipaes* Kunth. **L:** *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl.). Sendo todas reações positivas, variando de azul escuro a preto nas paredes celulares de todos os tecidos do mesofilo (A, B, C, D, E, G, H, J, K e L) e azul mais claro (setas) na cutícula (F) e células epidérmicas (I). Barra = 20µm.

Os lipídeos, além de constituintes das membranas celulares, podem auxiliar na prevenção de perda excessiva de água e na resistência a doença (MENEZES et al., 2003; TAIZ; ZEIGER, 2004). Sob o ponto de vista da cultura de tecidos a água pode ser um fator limitante em situações extremas, quando o subcultivo não ocorre regularmente, de maneira geral o suprimento de água para a microplanta é ideal.

A reação histoquímica para amido foi negativa em todas as espécies (Figura 5), exceto para mogno (Figura 5A), na qual se pode observar a

presença de grânulos de amido nas células do parênquima paliçádico. Tal resposta é comum a grande parte das espécies, podendo ser benéfica do ponto de vista metabólico, uma vez que o amido pode afetar diretamente as reações fotossintéticas da planta, pois dificulta a chegada do dióxido de carbono aos sítios de carboxilação da Rubisco (NASCIMENTO-SILVA et al., 2008).

Além disso, ressalta-se, que a cultura *in vitro* ocorre em ambiente controlado, que supri as necessidades nutricionais das microplantas pelo uso de meios de cultivo balanceados e

adequados a cada espécie, não havendo, portanto, a necessidade de acumular substâncias de reserva como é o caso do amido. Neste aspecto, as microplantas podem ser consideradas como heterotróficas, tendo sua fotossíntese alterada pelo teor de açúcares exógenos disponíveis no meio de cultura

(VAN LE et al., 2001; ESCALONA et al., 2003). A heterotrofia ou mixotrofia contribui para a reciclagem dos produtos da respiração celular fazendo com que a fotossíntese deixe de ser a principal fonte de carbono (ABREU-TARAZI, 2010; VALERO-ARACAMA, 2005).

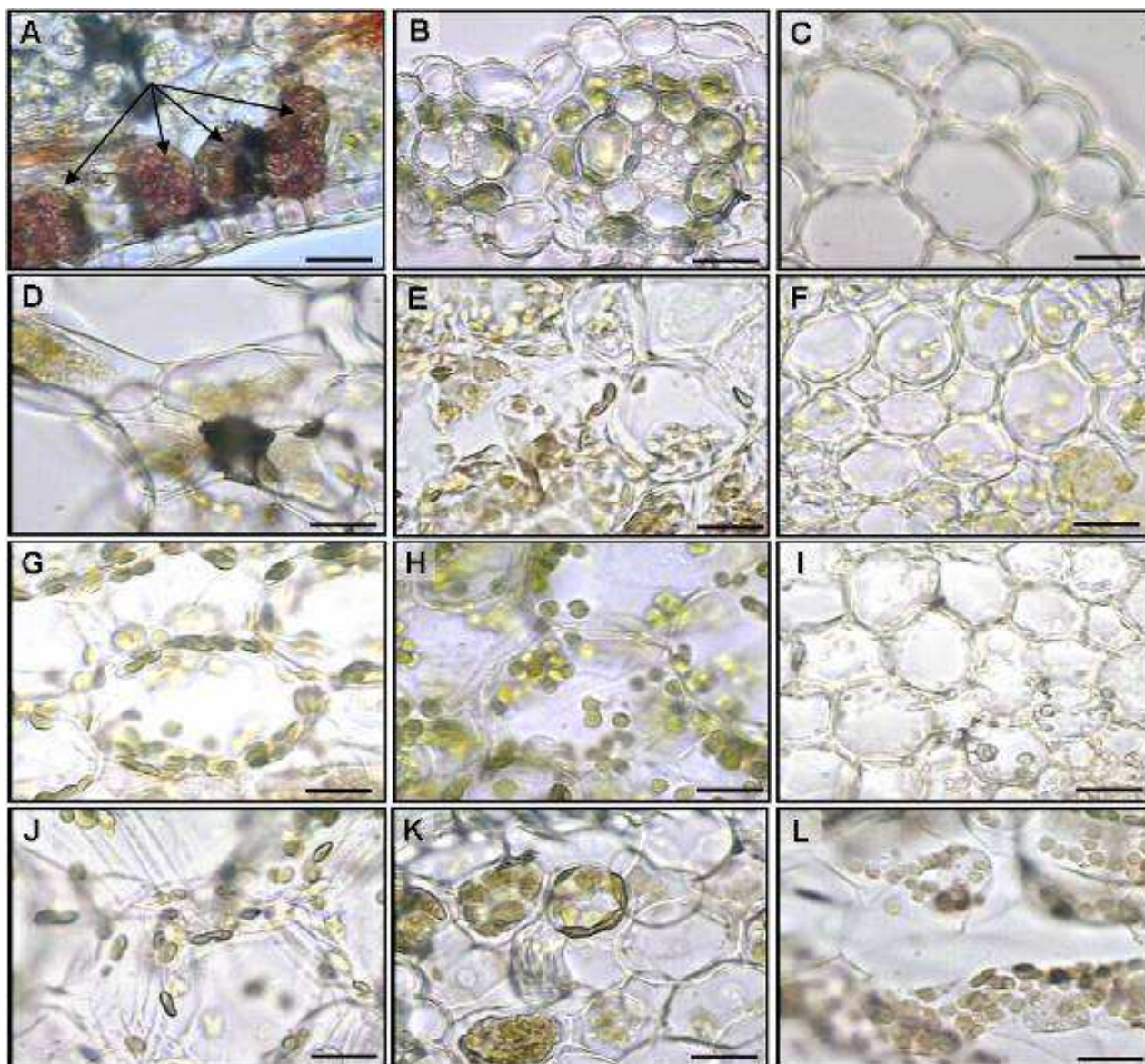


Figura 5 – Reação de amido em secções transversais do terço médio da lâmina foliar das microplantas. **A:** *Swietenia macrophylla* King. **B:** *Saccharum officinarum* L. **C:** *Ocimum basilicum* L. **D:** *Curcuma zedoaria* (Berg.) Rosc. **E:** *Pinus taeda* L. **F:** *Eucalyptus globulus* Labill. **G:** *Ananas comosus* L. Merrill. **H:** *Oncidium flexuosum* Sims. **I:** *Tectona grandis* Linn. f. **J:** *Viola odorata* L. **K:** *Bactris gasipaes* Kunth. **L:** *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl.). Sendo que em A a reação foi positiva com presença de grânulos de amido (setas) nas células do parênquima paliçadico e as demais reação negativa. Barra = 20µm.

Sendo assim, foi possível verificar a importância da análise histoquímica, pela sua rapidez na obtenção dos resultados, como

ponto de partida para bioprospecção de compostos de interesse farmacológico produzidos pelas plantas ou por endófitos, bem como, observar a diversidade de

respostas obtidas, devido principalmente às características intrínsecas de cada espécie estudada, dificultando sobremaneira o estabelecimento de uma relação direta entre os microrganismos e a produção de qualquer um dos compostos avaliados. Porém, Polesi (2010) verificou a presença de uma comunidade microbiana endofítica onipresente nessas espécies, que apresentavam-se assintomáticas, ou seja, não manifestavam a presença de microrganismos endofíticos.

Cabe salientar, ainda, que testes preliminares de isolamento de microrganismos endofíticos, nestas espécies de microplantas, foram realizados, obtendo-se o isolamento de bactérias do gênero *Bacillus*, *Methylobacterium* e *Acinetobacter*, resultado que confirma a inexistência de plantas verdadeiramente axênicas. Todos os gêneros são frequentemente isolados de diferentes espécies vegetais e possuem papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como na produção de compostos bioativos de interesse farmacológico (STURZ; NOWAK, 2000; JUNG et al., 2006; LACAVALA et al., 2006; FORCHETTI et al., 2007; ONGENA; JACQUES, 2008; THOMAS et al., 2008; CHO et al., 2009).

CONCLUSÃO

As características histoquímicas relatadas permitiram mostrar uma variedade de respostas intrínsecas a cada espécie de microplanta, estágio de desenvolvimento *in vitro* (multiplicação celular, alongamento celular, etc.), status nutricional, estágio fisiológico ou, ainda, à microbiota endofítica associada. No entanto, a responsabilidade direta e/ou exclusiva dos endófitos na produção de um determinado metabólito, torna-se muito dificultada e, em alguns casos, arbitrária, uma vez que diversos estudos têm demonstrado que as relações dentro da comunidade endofítica e entre elas e seu hospedeiro, é extremamente variável e regulada por inúmeros fatores (bióticos e abióticos), que podem determinar os metabólitos e suas concentrações produzidas pela planta ou por eles. Dessa maneira, estudos mais aprofundados do ponto de vista funcional

(expressão gênica, metagênicas, metabômicas, etc) dos endófitos podem responder a tais questionamentos, trazendo luz ao entendimento das relações microrganismo/planta e os diferentes papéis que desempenham nestas relações, seja pela produção ou estímulo à produção de compostos, podendo, inclusive, auxiliar em uma prospecção mais eficiente de compostos de interesse farmacológico e medicinal.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pela bolsa de mestrado concedida à Natalia Pimentel Esposito Polesi.

REFERÊNCIAS

ABREU-TARAZI, M.F. **Comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e sua influência na morfofisiologia após antibioticoterapia.** 2010. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade de São Paulo, ESALQ-USP, Piracicaba, 2010.

ALMEIDA, C.V.; et al. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1757-1764, 2009.

ASCENSÃO, L. **Métodos histoquímicos em vegetais.** Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2003.

AZEVEDO, J.L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 40-65, 2000.

BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, v. 204, p. 153-168, 1998.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. P. **Botanical Microtechnique and Citochemistry.** Iowa: State University Press, v. 326 p. 1976.

CHO, K.M. et al. Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. **Food Control**, v. 20, p. 402-406, 2009.

COSTA, A.F.; CUNHA, A. P. **Farmacognosia.** 3.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, v.3., 2000.

- CROTEAU, R. et al. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.
- CUNHA, A. P. de; ROQUE, O .R. Compostos Fenólicos: Características e Origem Biossintética. p. 212- 224. In: CUNHA, A.P. de, 2005. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Guilbenkian, p. 670, 2005.
- ESCALONA, M. et al.. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 39, p. 651-656, 2003.
- FORCHETTI, G. et al. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 1145-1152, 2007.
- GANGADEVI,V.; MUTHUMARY, J. Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p.717–724, 2008.
- GERSBACH, P.V. The Essential Oil Secretory Structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). **Annals of Botany**, v.89, n.3, p.255-260, 2002.
- GIADA, M.L.R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **Publ. UEPG : Ci. Biol. Saúde**, v.12, n.4, p. 7-15, 2006.
- GOND, S. K.et al.. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) from Varanasi (India). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p.1371–1375, 2007.
- MENEZES, N.L. de; SILVA, D. da C.; MELO-DEPINNA, G.F. de A.. Folha. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M.. **Anatomia Vegetal**. Viçosa-MG:Editora UFV, 2003. p. 303-311
- NASCIMENTO-SILVA, O.; CHINALIA, L. A.; PAIVA ,J. G. A. de. Caracterização histoquímica dos folíolos de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae Lindl.). **Revista Caatinga**, v. 21, n. 3, p. 62-68, 2008.
- ONGENA, M.; JACQUES, P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 115–125, 2008.
- GUO, B.et al. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136–142, 2008.
- JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.
- JUNG, W.J.et al. Treatment of *Paenibacillus illinoisensis* suppresses the activities of antioxidative enzymes in pepper roots caused by *Phytophthora capsici* infection. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 901-907, 2006.
- KIKUCHI, T.Y.U. P.; POTIGUARA, R.C.V.; SANTOS, P.P. dos. Caracterização histoquímica e ultra-estrutural do estipe de *Socratea exorrhiza* (Mart.) H. Wendl. (Arecaceae). **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi: Ciências Naturais**, v. 2, n. 2, p. 61-68, 2007.
- KUKLINSKI, C. **Farmacognosia: estudo de lãs drogas y sustancias medicamentosas de origen natural**. Barcelona: Ediciones Omega, 2000.
- LACAVA, P. T. et al. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 637-642, 2006.
- LIN, X. et al. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p.1037–1040, 2007.
- MADHAIYAN, M.et al. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, p. 315-324, 2004.
- MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000.
- MARTINS, E. R.et al.. **Plantas Mediciniais**. Viçosa: UFV. 1994. 220p.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry Theoretical and Applied**. Boston : Little, Brown & Company, 1968.
- PIOTTO, K. D. B. **Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento in vitro de clones de Eucalyptus benthamii Maiden & Cabbage**. 2013, 157f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- POLESI, E. N. P. **Investigação da microbiota endofítica onipresente em microplantas “axênicas”**. 2010, 120f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

- SAIKKONEN, K. Forest structure and fungal endophytes. **Fungal Biology Reviews**, v.21, p. 67–74, 2007.
- SANTOS, M. C. A. et al. Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.9, n.1, p. 24- 30, 2009.
- STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of Rhizobacteria and the strategies required creating yield-enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 183-190, 2000.
- SUN, L. et al. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, v. 55, p. 415–424, 2008.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p. 309-334, 2004.
- THOMAS, P. et al. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 93, p.55–63, 2008.
- TROTEL-AZIZ, P. et al. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. Mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 64, p. 21-32, 2008.
- VALERO-ARACAMA, C. *Physiological and anatomical basis for differences in growth performance during in vitro and ex vitro culture of sea oats (Uniola paniculata L.) genotypes*. 2005. 173f. Tese (Doutorado) - University of Florida, Gainesville, 2005.
- VAN LE, Q.U.Y.; SAMSON, G.U.Y.; DESJARDINS, Y. Opposite effects of exogenous sucrose on growth, photosynthesis and carbon metabolism of in vitro plantlets of tomato (*L. esculentum* Mill.) grown under two levels of irradiances and CO₂ concentration. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 599-606, 2001.