



ALESSANDRA APARECIDA FERREIRA

**PRODUÇÃO DE ARBUTINA E COMPOSTOS ORGÂNICOS
VOLÁTEIS EM *Origanum majorana* L. (Lamiaceae)
CULTIVADA COM FUNGOS DO GÊNERO *Paraconiothyrium***

**LAVRAS - MG
2025**

ALESSANDRA APARECIDA FERREIRA

**PRODUÇÃO DE ARBUTINA E COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM
Origanum majorana L (Lamiaceae) CULTIVADA COM FUNGOS DO GÊNERO
*Paraconiothyrium***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para obtenção do título de Doutora.

**Orientadora
Profa. Dra. Patrícia Gomes Cardoso**

**LAVRAS – MG
2025**

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Ferreira, Alessandra Aparecida.

Produção de arbutina e compostos orgânicos voláteis em *Origanum
majorana* L. (Lamiaceae) cultivada com fungos do gênero
Paraconiothyrium / Alessandra Aparecida Ferreira. - 2025.
54 p.

Orientadora: Patrícia Gomes Cardoso

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de
Lavras, 2025. Bibliografia.

1. Endofíticos. 2. *Paraconiothyrium cyclothyrioides*. 3.
Paraconiothyrium estuarinum. 4. cultura de tecido. 5. Metabólicos
secundários. I. Gomes Cardoso, Patrícia. II. Universidade Federal de
Lavras. III. Título.

ALESSANDRA APARECIDA FERREIRA

**PRODUÇÃO DE ARBUTINA E COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM
Origanum majorana L (Lamiaceae) CULTIVADA COM FUNGOS DO GÊNERO
*Paraconiothyrium***

**PRODUCTION OF ARBUTIN AND VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN
Origanum majorana L (Lamiaceae) CULTIVATED WITH FUNGI OF THE
GENUS *Paraconiothyrium***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 09 de julho de 2025.

Profa. Dra. Patrícia Gomes Cardoso	UFLA
Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci	UFLA
Prof. Manuel Losada Gavilanes	UFLA
Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto	UFLA
Profa. Dra. Alcilene de Abreu Pereira	IF SUDESTE MG

Profa. Dra. Patrícia Gomes Cardoso
Orientadora

**LAVRAS – MG
2025**

Para a Julia, meu equilíbrio.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha orientadora, Prof^a Patricia Gomes Cardoso, pela oportunidade de regresso ao meio acadêmico, pela confiança, orientação e incentivo ao longo dessa jornada.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Agricultura (DAG), ao Programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares, aos Laboratórios de Cultura de Tecidos e Fitoquímica de Plantas Medicinais e ao Laboratório de Bioprospecção e Genética de Fungos Filamentosos (DBI), UFLA por possibilitarem a realização do Doutorado.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares, pela acolhida, ensinamentos, aconselhamento. Gratidão!

Agradeço aos membros da banca examinadora, por dedicarem seu tempo e expertise na avaliação deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório BIOGEN, agradeço pela convivência, ajuda mútua e pelos aprendizados compartilhados ao longo desta trajetória. Estendo meus agradecimentos ao corpo técnico e aos funcionários que não mediram esforços em minha ajuda.

Agradeço aos irmãos do Horto de Plantas Medicinais, que Deus colocou em meu caminho suavizando essa trajetória. Gratidão!

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo ambiente acadêmico de excelência e pela formação de qualidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a construção deste trabalho, deixo o meu mais sincero agradecimento.

Gratidão!

RESUMO

Fungos endofíticos são conhecidos por modular a biossíntese de metabólitos secundários em plantas hospedeiras, influenciando características fisiológicas e químicas importantes. *Paraconiothyrium estuarinum* e *Paraconiothyrium cyclothyrioides*, isolados de gramíneas forrageiras, demonstraram potencial no controle biológico e na promoção do crescimento vegetal. *Origanum majorana* (manjerona) é uma espécie medicinal e aromática valorizada por seus compostos bioativos, incluindo arbutina, um glicosídeo fenólico com notáveis aplicações dermatocósméticas. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da inoculação fúngica no acúmulo de matéria seca, índice de vegetação normalizada, teor relativo de clorofila, teores de arbutina e dos compostos voláteis de *Origanum majorana*. Mudanças de manjerona micropropagadas foram inoculadas com extratos fúngicos obtidos a partir do cultivo dos endofíticos em meio BD (batata-dextrose), durante o transplante das mudas para vasos contendo substrato comercial e foram cultivadas em casa de vegetação por noventa dias. O teor de arbutina foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD), e os compostos voláteis foram analisados por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC-MS). *P. estuarinum* (CML 3699) e *P. cyclothyrioides* (CML 3697) promoveram ganho na capacidade fotossintética e no acúmulo de biomassa, refletindo no aumento da clorofila e no peso seco das folhas e do caule. Variações expressivas foram observadas em três constituintes principais: *o*-cimeno, γ -terpineno e α -terpineol. O conteúdo de *o*-cimeno nas plantas inoculadas com o *P. estuarinum* atingiu 22,57% enquanto o controle obteve uma concentração de 7,53%. Notavelmente, *P. cyclothyrioides* (CML 3698) aumentou significativamente os teores de arbutina (5,30 mg g⁻¹) em comparação à planta não inoculada (4,89 mg g⁻¹). Esses achados sugerem que espécies de *Paraconiothyrium* podem ativar vias metabólicas importantes na manjerona, melhorando tanto a qualidade fitoquímica quanto o potencial valor industrial das plantas medicinais.

Palavras-chave: Endófitos; *Paraconiothyrium estuarinum*; *Paraconiothyrium cyclothyrioides*; cromatografia gasosa; metabólitos secundários; cultura de tecido.

ABSTRACT

Endophytic fungi are known to modulate the biosynthesis of secondary metabolites in host plants, influencing important physiological and chemical characteristics. *Paraconiothyrium estuarinum* and *Paraconiothyrium cyclothyrioides*, isolated from forage grasses, have demonstrated potential for biological control and plant growth promotion. *Origanum majorana* (marjoram) is a medicinal and aromatic species valued for its bioactive compounds, including arbutin, a phenolic glycoside with notable dermocosmetic applications. This study aimed to evaluate the effects of fungal inoculation on dry matter accumulation, normalized vegetation index, relative chlorophyll content, arbutin content, and volatile compounds of *Origanum majorana*. Micropropagated marjoram seedlings were inoculated with fungal extracts obtained from endophytic cultivation in BD (potato dextrose) medium during transplantation into pots containing commercial substrate and grown in a greenhouse for ninety days. Arbutin content was determined by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD), and volatile compounds were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *P. estuarinum* (CML 3699) and *P. cyclothyrioides* (CML 3697) promoted an increase in photosynthetic capacity and biomass accumulation, reflected in increased chlorophyll content and leaf and stem dry weight. Significant variations were observed in three main constituents: *o*-cymene, γ -terpinene, and α -terpineol. The *o*-cymene content in plants inoculated with *P. estuarinum* reached 22.57%, while the control had a concentration of 7.53%. Notably, *P. cyclothyrioides* (CML 3698) significantly increased arbutin contents (5.30 mg g⁻¹) compared to the uninoculated plant (4.89 mg g⁻¹). These findings suggest that *Paraconiothyrium* species can activate important metabolic pathways in marjoram, improving both the phytochemical quality and the potential industrial value of medicinal plants.

Keywords: Endophytes; *Paraconiothyrium estuarinum*; *Paraconiothyrium cyclothyrioides*; gas chromatography; secondary metabolites; tissue culture.

INDICADORES DE IMPACTO

O presente trabalho apresenta impactos científicos e tecnológicos com potencial aplicação nas áreas de agricultura sustentável e valorização de plantas medicinais. A inoculação de *Origanum majorana* com fungos endofíticos do gênero *Paraconiothyrium* modulou vias metabólicas relacionadas à produção de compostos bioativos, como arbutina e voláteis de interesse industrial.

Impacto tecnológico: A abordagem com microrganismos endofíticos representa uma estratégia biotecnológica de baixo custo e potencial aplicação na produção de bioativos vegetais, podendo ser integrada a sistemas de cultivo controlado e à cadeia produtiva de insumos naturais para uso farmacêutico e cosmético.

Impacto científico: Este estudo amplia o conhecimento sobre as interações planta-fungo e elucidada, pela primeira vez, o efeito de espécies de *Paraconiothyrium* na modulação fitoquímica de *Origanum majorana*, com destaque para o aumento da arbutina e de voláteis como *o*-cimeno e linalol.

Impacto ambiental: Os compostos identificados possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e inseticidas, reforçando o potencial de aplicação em defensivos naturais e no desenvolvimento de tecnologias mais limpas, com menor dependência de insumos sintéticos.

Aplicabilidade futura: Embora esta pesquisa tenha sido conduzida em ambiente experimental, os resultados geram subsídios para estudos de validação em campo e desenvolvimento de bioinsumos. O modelo pode ser adaptado futuramente para sistemas produtivos diversos, inclusive em contextos de agricultura familiar e orgânica, mediante novas parcerias e testes em escala ampliada.

IMPACT INDICATORS

This work presents scientific and technological impacts with potential application in the areas of sustainable agriculture and the valorization of medicinal plants. The inoculation of *Origanum majorana* with endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* modulated metabolic pathways related to the production of bioactive compounds, such as arbutin, and volatiles of industrial interest.

Technological Impact: The approach with endophytic microorganisms represents a low-cost biotechnological strategy with potential application in the production of plant bioactives, which can be integrated into controlled cultivation systems and the production chain of natural ingredients for pharmaceutical and cosmetic use.

Scientific Impact: This study expands knowledge on plant-fungus interactions and elucidates, for the first time, the effect of *Paraconiothyrium* species on the phytochemical modulation of *Origanum majorana*, highlighting the increase in arbutin and volatiles such as *o*-cymene and linalool.

Environmental Impact: The identified compounds possess antimicrobial, antioxidant, and insecticidal properties, reinforcing their potential for application in natural pesticides and the development of cleaner technologies, with less reliance on synthetic inputs.

Future Applicability: Although this research was conducted in an experimental setting, the results provide support for field validation studies and the development of bioinputs. The model can be adapted in the future for various production systems, including family and organic farming, through new partnerships and larger-scale testing.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Gênero <i>Paraconiothyrium</i>	14
2.2 <i>Origanum majorana</i>	15
2.3 Biossíntese e Ocorrência de arbutina.....	16
REFERÊNCIAS	18
SEGUNDA PARTE.....	21
ARTIGO 1 - ELICITAÇÃO DE ARBUTINA E COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM MANJERONA CULTIVADA COM FUNGOS DO GÊNERO <i>PARACONIOTHYRIUM</i>	21
RESUMO	21
ELICITATION OF ARBUTIN AND VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN MARJORAM CULTIVATED WITH FUNGI OF THE GENUS <i>PARACONIOTHYRIUM</i>	22
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Estabelecimento in vitro das mudas.....	24
2.2 Indução de enraizamento	25
2.3 Cultivo dos Fungos endofíticos.....	25
2.4 Aclimatização das mudas e inoculação com fungos endofíticos.....	26
2.5 Avaliações fisiológicas	26
Análises da arbutina.....	28
Preparo da amostra.....	28
Condições cromatográficas	28

Caracterização e quantificação.....	29
Fração volátil de <i>Origanum majorana</i>	30
3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI).....	31
4.2 Índice de Clorofia Falker (ICF)	32
4.3 Produção de matéria seca.....	34
4.4 Análises da arbutina	36
4.5 Análise da fração volátil de <i>O. majorana</i> associada a fungos endofíticos.....	41
4.6 Análise dos Componentes Principais.....	43
5 CONCLUSÃO.....	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS	48

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são conhecidos por produzirem metabólitos bioativos com aplicações biotecnológicas de interesses para as indústrias farmacêuticas, alimentícias e agrícolas (Pardo et al., 2022). Dentre desses metabólitos secundários, os fungos endofíticos podem sintetizar compostos orgânicos voláteis (COVs), que interagem com o hospedeiro conferindo resistência contra patógenos e estimulando o crescimento (Werner et al., 2016).

Os endofíticos colonizam o interior das plantas sem causar-lhe danos, além de proporcionar benefícios ao hospedeiro (Azevedo et al., 1998). Alguns endofíticos são capazes de sintetizar metabólitos secundários semelhantes aos metabólitos da planta hospedeira por meio de vias bioquímicas comuns compartilhadas pelo metabolismo primário e secundário (Strobel et al., 2003). Essa capacidade pode estar associada a processos evolutivos, nos quais interações prolongadas entre microrganismo e planta possibilitaram uma troca genética, potencialmente por meio de transferência horizontal de genes (Tan et al., 2001). Esse mecanismo pode ter conferido ao endofítico a habilidade de realizar as mesmas reações biossintéticas da planta hospedeira (Sarkar et al., 2021).

A existência de endofíticos em plantas medicinais tem sido constatada em inúmeras espécies, estando muitas vezes envolvidos em complexas relações de síntese, acúmulo e degradação de metabólitos secundários de interesse econômico (Peixoto et al., 2004). Em plantas medicinais, essa associação é facilitada pela produção de exsudados radiculares ricos em compostos fenólicos, que atraem fungos capazes de metabolizar substratos complexos.

Os estudos de Stierle et al., (1993) ampliaram o interesse na microbiota endofítica associada a plantas medicinais, ao demonstrarem que o fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), é capaz de produzir o diterpenoide taxol. *Paraconiothyrium SSM001* isolado de diferentes espécies de *Taxus* (*Taxus brevifolia*) aumentou o rendimento de taxol pela co-cultura com *Alternaria alternata* e *Phomopsis* spp. (Soliman e Raizada, 2013).

A síntese de compostos bioativos por microrganismos endofíticos apresenta um potencial biotecnológico significativo, podendo reduzir a necessidade de coleta de espécies vegetais raras, de crescimento lento ou ameaçadas, contribuindo assim para a conservação da biodiversidade (Aly et al., 2010).

Origanum majorana, popularmente conhecida como manjerona, é uma planta herbácea

perene pertencente à família Lamiaceae. Originária da região do Mediterrâneo, especialmente de países como Marrocos, Argélia e Egito, a manjerona tem sido cultivada e utilizada desde a antiguidade por suas propriedades aromáticas e medicinais (Bina et al., 2016). Na medicina tradicional, diversas culturas atribuíram à manjerona uma ampla gama de aplicações terapêuticas. No Irã, por exemplo, suas folhas são utilizadas como antimicrobiano, antisséptico, carminativo e para tratar distúrbios gastrointestinais, dores de cabeça e epilepsia. Na Turquia, seu óleo essencial é empregado no tratamento de asma, indigestão e reumatismo. No Marrocos, é utilizada como planta antihipertensiva (Wang et al., 2021).

A composição fitoquímica da manjerona é rica e diversificada, incluindo monoterpenos como α -pineno, γ -terpineno e terpinen-4-ol, além de compostos fenólicos como ácido rosmarínico, arbutina e os flavonóides luteolina e apigenina. Esses compostos conferem à planta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e hepatoprotetoras, entre outras (Bouyahya et al., 2021). Dentre esses, a arbutina é um composto de interesse da indústria dermocosmética.

A arbutina (ou β -arbutina) é um glicosídeo de hidroquinona amplamente distribuído em plantas medicinais, com destaque para espécies dos gêneros *Arctostaphylos*, *Pyrus* e *Origanum*. No caso das espécies de *Origanum* contêm teores variáveis de arbutina em função de fatores ambientais e genéticos (MIGAS; KRAUZE-BARANOWSKA, 2015). Trata-se de uma substância de elevado interesse farmacêutico, especialmente na indústria cosmética, onde é empregada como agente despigmentante devido à sua capacidade de inibir a enzima tirosinase, envolvida na biossíntese da melanina (Kim et al., 2018). Além disso, apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e atividade antimicrobiana, o que amplia suas possibilidades de aplicação em formulações dermatológicas e medicamentosas (SAEEDI et al., 2021). Em *Origanum majorana*, a presença de arbutina tem sido confirmada por meio de técnicas cromatográficas, embora sua concentração pode variar de 0,2% a 11,8% conforme o ambiente, a fase fenológica e a microbiota associada a planta (Lukas et al., 2010).

Assim, torna-se relevante investigar estratégias biotecnológicas que possam induzir o acúmulo de arbutina em *Origanum majorana*. Com isto, o presente trabalho objetivou avaliar a resposta no crescimento e no metabolismo de pigmentos fotossintetizantes, teores de arbutina e composição volátil de *O. majorana* cultivadas com e sem a inoculação de fungos endofíticos do gênero *Paraconiothyrium* Verkley (2004).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Paraconiothyrium*

Os microrganismos endofíticos são reconhecidos pela capacidade de modular vias metabólicas em plantas hospedeiras, promovendo a produção de metabólitos secundários com valor farmacológico e ecológico. Esses microrganismos podem atuar como eliciadores, desencadeando respostas de defesa e aumentando a síntese de compostos como alcalóides, flavonóides, terpenoides e compostos fenólicos (Kusari et al., 2012; Kaul et al., 2013). Em espécies medicinais, essa interação tem sido valorizada na bioprospecção de novas substâncias bioativas com aplicação farmacêutica e agrícola (Verma et al., 2019).

O gênero *Paraconiothyrium* é considerado cosmopolita, tendo uma ampla variedade de hospedeiros e ampla distribuição geográfica é encontrado como endofítico em uma gama de hospedeiros vegetais. Pertencente a família Sphaeropsidaceae, ordem *Sphaeropsidales*; da classe *Coelomycetes* (Fungos Imperfeitos), o gênero *Paraconiothyrium* foi descrito e nomeado por Verkley em 2004, incluindo quatro novas espécies baseadas em seu estágio reprodutivo anamorfo *in vitro*: *Paraconiothyrium estuarinum* (espécie-tipo); *Paraconiothyrium cyclothyrioides*, isolado pela primeira vez de uma amostra de solo em Papua, Nova Guiné, em 1995; *Paraconiothyrium brasiliensis* e *Paraconiothyrium fungicola*. Posteriormente mais quatro espécies foram descritas: *Paraconiothyrium africanum*; *Paraconiothyrium babiogoreense*; *Paraconiothyrium hawaiiensis* e *Paraconiothyrium variable* (Damm et al., 2008; Budziszewska et al., 2011), compreendendo um total de 27 espécies dentro desse gênero.

Diversos isolados desse gênero têm demonstrado capacidade de modular respostas metabólicas em culturas vegetais, inclusive em condições de estresse abiótico (Wang et al., 2021). Um exemplo de aplicação na agricultura, é o *Coniothyrium minitans*, parasita fúngico utilizado no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.

Outra atividade comprovada do fungo do gênero *Paraconiothyrium* isolado das raízes de pimentão (*Capsicum annuum*), foi a inibição de 100% na germinação de *Echinochloa crus-galli* (Khan et al, 2012). As espécies *P. brasiliensis* e *P. variable*, endofíticos de *Taxus*, podem produzir e também aumentar o rendimento do medicamento antitumoral paclitaxel (Fan et al., 2019). *P. estuarinum* mostrou capacidade degradativa em processos de biorremediação (Pereira et al., 2010).

Paraconiothyrium estuarinum e *Paraconiothyrium cyclothyrioides* isolados de

Brachiaria spp. e *Megathyrus maximus* (syn. *Panicum maximum*) promoveram o aumento de biomassa em gramíneas (Gama et al., 2020) por meio de atividades enzimáticas, produção de fitohormônios, sideróforos e atividade antioxidante (Sarkar et al., 2021).

Compostos orgânicos voláteis (COVs) são metabólitos secundários de baixa massa molecular e alta volatilidade, com funções ecológicas cruciais na comunicação planta-microrganismo. Fungos endofíticos podem modular a produção desses compostos, induzindo perfis químicos específicos em resposta à colonização (Bitas et al., 2013). Os COVs produzidos por endofíticos pertencem a diversas classes químicas como hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, álcoois, aldeídos, ésteres, terpenos além de compostos contendo nitrogênio e enxofre, podendo ser derivados tanto de vias metabólicas primárias quanto secundárias (Morath e Bennett, 2012), apresentando aplicações para novos produtos biotecnológicos. Os COVs exercem funções ecológicas críticas, como comunicação interespecie e defesa contra patógenos, enquanto suas propriedades físico-químicas os tornam viáveis para uso industrial. Hidrocarbonetos como o limoneno e α -pineno demonstram potenciais para uso como biocombustíveis (Strobel et al., 2014). Na agricultura os COVs atuam como biocontrole de fitopatógenos. Fungos do gênero *Trichoderma*, por exemplo, produzem COVs que inibem em até 35% o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos, além de alterar morfológicamente suas hifas (Silva et al., 2019).

Em plantas medicinais, os COVs não apenas afetam interações bióticas, mas também representam parte essencial dos produtos com valor comercial, como os óleos essenciais (Dudareva et al., 2013). A eliciação de COVs por endofíticos tem sido relatada como um mecanismo de indução sistêmica de defesa e como alternativa para produção sustentável de bioativos (Sharifi et al., 2018).

Fungos do gênero *Paraconiothyrium* mostraram eficácia no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* e na promoção da germinação de sementes de gramíneas (Alves et al., 2021).

2.2 *Origanum majorana*

Origanum majorana, conhecida como manjerona, é uma erva aromática da família Lamiaceae, amplamente distribuída pela Europa, Ásia e Norte da África e cultivada em diversas regiões, incluindo o Brasil (Chishti et al., 2013; Méabed et al., 2018). Sua utilização remonta à antiguidade, sendo empregada tanto na culinária quanto na medicina tradicional (Rodrigues et al., 2005; Charles, 2013). Historicamente, a manjerona era considerada uma planta sagrada

pelos antigos gregos e romanos, simbolizando felicidade e sendo associada à deusa Afrodite. Seu uso era comum em rituais e como planta ornamental. Durante a Idade Média, seu cultivo se espalhou pela Europa, sendo valorizada tanto por suas propriedades culinárias quanto terapêuticas (Bouyahya et al., 2021). No Brasil, é amplamente cultivada para fins culinários, medicinais e cosméticos. Agronomicamente, trata-se de uma espécie adaptável a diferentes tipos de solo e clima, com ciclo de crescimento relativamente curto e alta capacidade de regeneração após cortes (D'Antuono et al., 2000).

A espécie apresenta crescimento perene, podendo atingir até 60 cm de altura, com folhas elípticas e flores brancas ou avermelhadas (Baldoni, 2017; Bina et al., 2017; Bouyahya et al., 2021). Seu cultivo é favorecido em climas temperados, com solo fértil e bem drenado, e pode ser propagado por sementes ou estacas (EMBRAPA, 2007; Ziech et al., 2020).

Tradicionalmente, a manjerona é utilizada como antisséptico, expectorante e carminativo na medicina popular (El-Said et al., 2014). Sua composição é dominada por monoterpenos como γ -terpineno, *o*-cimeno, timol e carvacrol, além de fenóis e sesquiterpenos. Esses compostos conferem ao óleo essencial atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante e repelente de insetos (Marchese et al., 2016; Bakkali et al., 2008).

Atividades biológicas dos extratos metanólicos e do óleo essencial de *Origanum majorana* mostraram propriedades antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, Pneumonia por *Klebsiella*, *Salmonella coleraensius*, *Serratia* sp., e outros (Busatta et al., 2008; Hajlaoui et al., 2016; Amor et al., 2019); atividade antifúngica contra fungos patogênicos como *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium cyclopium*, *Phytophthora* sp., *Candida* sp., e outros. Além disso, pesquisas indicam sua eficácia no controle de patógenos e pragas agrícolas, sugerindo aplicações na agroindústria e no desenvolvimento de biofungicidas sustentáveis (Chaves et al., 2019; Rus et al., 2015).

2.3 Biossíntese e Ocorrência de arbutina

A arbutina é um glicosídeo de hidroquinona amplamente distribuído no reino vegetal e tem despertado grande interesse devido ao seu perfil multifuncional. Entre suas principais propriedades, destacam-se os efeitos despigmentantes, resultado da inibição competitiva da enzima tirosinase – fundamental na síntese de melanina – o que a torna amplamente utilizada em formulações cosméticas para o tratamento de hiperpigmentações cutâneas (Gallo et al., 2015; Kim et al., 2018). Além disso, apresenta relevante atividade antioxidante, protegendo estruturas celulares contra danos oxidativos, e propriedades anti-inflamatórias e

antimicrobianas, que ampliam seu potencial terapêutico (Saeedi et al., 2021; Balahbib et al., 2020).

A arbutina ocorre naturalmente em diversas espécies vegetais, como *Arctostaphylos uva-ursi*, *Vaccinium vitis-idaea* e *Origanum majorana*, podendo estar presente em maior ou menor quantidade conforme fatores ambientais, tais como disponibilidade hídrica, intensidade luminosa e temperatura (Lukas et al., 2010). A planta pode sintetizá-la como uma resposta adaptativa a estresses abióticos, como o frio ou a seca, sugerindo que esse metabólito possui papel fisiológico na proteção celular (Braga et al., 2020). Dessa forma, a variabilidade no conteúdo de arbutina em *Origanum majorana* pode ser explorada agronomicamente na seleção de genótipos com maior capacidade biossintética, visando aplicações comerciais e farmacêuticas (Lukas et al., 2010).

Existem duas isoformas principais de arbutina: a β -arbutina, predominante nas plantas e comumente extraída de fontes naturais, e a α -arbutina, que possui maior estabilidade química e eficácia despigmentante, geralmente obtida por processos enzimáticos ou biotecnológicos (Migas & Krauze-Baranowska, 2015; Rychlińska & Nowak, 2012). Ambas têm sido exploradas como alternativas mais seguras ao uso de hidroquinona pura, substância com efeitos colaterais e restrições legais em vários países. Do ponto de vista farmacológico, a arbutina também vem sendo estudada como agente antidiabético, devido à sua capacidade de modular enzimas envolvidas no metabolismo da glicose, além de apresentar efeitos hepatoprotetores e neuroprotetores em modelos experimentais (Saeedi et al., 2021). Essa diversidade de aplicações posiciona a arbutina como um composto bioativo de alto valor agregado.

A utilização de *Origanum majorana* como fonte de arbutina representa uma estratégia promissora, tanto pela facilidade de cultivo quanto pela possibilidade de substituir espécies ameaçadas tradicionalmente utilizadas para extração do composto, contribuindo para a conservação da biodiversidade e para o desenvolvimento sustentável de fitoprodutos (Migas & Krauze-Baranowska, 2015).

REFERÊNCIAS

- AHEMAD, Munees; KIBRET, Mulugeta. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King saud University-science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.
- AL-FATIMI, Mohamed. Volatile constituents, antimicrobial and antioxidant activities of the aerial parts of *Origanum majorana* L. from Yemen. **J. Pharm. Res. Int**, v. 23, n. 10, 2018.
- ALY, A.H, DEBBAD, A, KJER J, PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Divers** 2010; 41:1-16.
- ARAÚJO C.W.G, PEIXOTO NETO, P.A, CAMPOS, N.V.C, PORFIRIO, Z.A, CAETANO,L.C (2002). Antimicrobial activity of *Pithecellobium avaremotemo* bark. **Fitoterapia**, 73: 698- 700.
- ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F Bortolini, C. G. Forsthofer, E. L. Strieder, M. L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.158-167, 2001.
- AZEVEDO JL. Microrganismos endofíticos. In: Melo IS, Azevedo JL. Ecologia microbiana, Jaguariúna: **Emprapa** – CNPMA; 1998.
- BALAHBIB, Abdelaali et al. Health beneficial and pharmacological properties of *p*-cymene. **Food and Chemical Toxicology**, v. 153, p. 112259, 2021.
- BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo Augusto Boechat (Eds.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2009. 356 p.
- BINA, F.; Rahimi, R. Sweet Marjoram: A Review of Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Biological Activities. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2017, 22, 175–185.
- BOO, Yong Chool. Arbutin as a skin depigmenting agent with antimelanogenic and antioxidant properties. **Antioxidants**, v. 10, n. 7, p. 1129, 2021.
- BOUYAHYA, Abdelhakim et al. Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacology of *Origanum majorana* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 265, p. 113318, 2021.
- CHAPLA, Vanessa M.; BIASETTO, Carolina R.; ARAUJO, Angela R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.
- CHARLES, D.J. Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources; **Springer: London**, UK, 2013; ISBN 9781461443094.
- DA SILVA, L. R., de MELLO, S. C. M., MARTINS, I., & INGLIS, M. (2019). **Efeito de compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.**

ERENLER, Ramazan et al. Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 3, p. 822-836, 2016.

FAN, Xiaokuan et al. Endophytic fungal diversity on different aged bark of medicinal taxus plant species. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 13, n. 4, p. 544-549, 2019.

GAMA, Danielly de Souza et al. Endophytic fungi from *Brachiaria grasses* in Brazil and preliminary screening of *Sclerotinia sclerotiorum* antagonists. **Scientia Agricola**, v. 77, p. e20180210, 2019.

GAO (2003). Technology transfer in taxol development. **United States General Accounting Office**. June 2003.

GRISDALE, Sara K.; TOWERS, G. H. N. Biosynthesis of arbutin from some phenylpropanoid compounds in *Pyrus communis*. **Nature**, v. 188, n. 4756, p. 1130-1131, 1960.

KIM, Y. J. et al. Inhibitory effects of arbutin on melanin biosynthesis in α -MSH-stimulated B16 cells. **Fitoterapia**, v. 129, p. 92–98, 2018.

LEMFAK, Marie Chantal et al. mVOC: a database of microbial volatiles. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D744-D748, 2014.

LUKAS, B. et al. Essential oil diversity of European *Origanum* species. **Phytochemistry**, v. 71, n. 6-7, p. 594–602, 2010

MHLONGO, Msizi I. et al. The chemistry of plant–microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 112, 2018.

MIGAS, P.; KRAUZE-BARANOWSKA, M. Arbutin: occurrence, biological activity and perspectives. **Planta medica**, v. 81, n. 10, p. 965–975, 2015.

MORATH, S. U. BENNETT, R. W. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal biology reviews**, 2012, 26, 73.

MOLIN, José P. et al. Capacidade de um sensor óptico em quantificar a resposta da cana-de-açúcar a doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 1345-1349, 2010.

MORAES, Gleys Kellen Aquino et al. Atividade antagonista, alelopática e diversidade química de fungos endofíticos isolados de *Cochlospermum regium* L. **Revista Desafios–v**, v. 3, n. 1, 2023.

NAHAR, Lutfun et al. Arbutin: Occurrence in plants, and its potential as an anticancer agent. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8786, 2022.

PARDO, Sthefani Nicole Frosi et al. Avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos. **Braz J Dev**, v. 8, n. 5, p. 33120-40, 2022.

PEIXOTO, Pedro Accioly Neto Sá; DE AZEVEDO, João Lúcio; CAETANO, Luiz Carlos.

Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

PRERNA, Prerna; Neeru Vasudeva. *Origanum majorana* L.-**phyto- pharmacological review**. 2015.

SALEHI, Mina et al. Elicitors derived from endophytic fungi *Chaetomium globosum* and *Paraconiothyrium brasiliense* enhance paclitaxel production in *Corylus avellana* cell suspension culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 136, p. 161-171, 2019.

SAEEDI, M. et al. Arbutin: A review of its pharmacological and toxicological effects. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 9, p. 4863–4875, 2021.

SINGH, Vivek Kumar; KUMAR, Awanish. Secondary metabolites from endophytic fungi: Production, methods of analysis, and diverse pharmaceutical potential. **Symbiosis**, v. 90, n. 2, p. 111-125, 2023.

SOARES, D.; ROSA, L. H.; DA SILVA, J.; PIMENTA, R. A Uma revisão de compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais**, v. 12, n. 3, p. 331-352, 17 dez. 2017.

SOLIMAN, Sameh SM; RAIZADA, Manish N. Interactions between co-habiting fungi elicit synthesis of Taxol from an endophytic fungus in host Taxus plants. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 3, 2013.

SOUSA, Fulvia Soares Campos de. **Potencial biotecnológico de fungos endofíticos de *Pyrostegia venusta***. 2019. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/34614>.

STIERLE, Andrea; STROBEL, Gary; STIERLE, Donald. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STROBEL GA, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol and Mol Bio Rev** 2003; 67:491-502.

TAN, Ren Xiang; ZOU, Wen Xin. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural product reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1 - ELICITAÇÃO DE ARBUTINA E COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM MANJERONA CULTIVADA COM FUNGOS DO GÊNERO *PARACONIOTHYRIUM*

RESUMO

Os fungos endofíticos podem influenciar a biossíntese de metabólitos secundários em plantas hospedeiras, promovendo benefícios fisiológicos e bioquímicos. Alguns endofíticos sintetizam e metabolizam compostos orgânicos voláteis (COVs) com potenciais aplicações biotecnológicas na agricultura, indústria e medicina. Este estudo avaliou a interação dos isolados *Paraconiothyrium estuarinum* e *Paraconiothyrium cyclothyrioides*, provenientes de gramíneas, na modulação de arbutina, nos parâmetros fisiológicos e no perfil de compostos voláteis da manjerona (*Origanum majorana*). Mudanças de manjerona, obtidas por cultura de tecidos, foram aclimatizadas e inoculadas com extratos fúngicos (obtidos por cultivo dos endofíticos em meio BD - batata+dextrose). Esta inoculação ocorreu no momento do transplante das mudas para vasos contendo substrato comercial, sendo cultivadas em casa de vegetação por noventa dias. A quantificação da arbutina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Os resultados indicam que os endofíticos influenciaram significativamente as características fisiológicas e o teor de arbutina. *P. estuarinum* (CML 3699) e *P. cyclothyrioides* (CML 3697) proporcionaram aumento de até 11% nos teores de clorofila e incrementos na biomassa seca de 30% e 21%, respectivamente, em comparação com o isolado de menor desempenho. *P. estuarinum* (CML 3695) modulou a produção de *o*-cimeno e linalol, enquanto *P. cyclothyrioides* (CML 3698) proporcionou um aumento de 8% nos teores de arbutina em relação às plantas não inoculadas. Esses resultados sugerem que *Paraconiothyrium* spp. possuem potencial para elicitar vias metabólicas essenciais na manjerona, promovendo ganhos nas características fisiológicas avaliadas e na modulação do perfil fitoquímico da planta.

Palavras-chave: fungos endofíticos; *Paraconiothyrium estuarinum*; *Paraconiothyrium cyclothyrioides*; cromatografia gasosa; *Origanum majorana*; cultura de tecido.

**ELICITATION OF ARBUTIN AND VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN
MARJORAM CULTIVATED WITH FUNGI OF THE GENUS
PARACONIOTHYRIUM**

ABSTRACT

Endophytic fungi can influence the biosynthesis of secondary metabolites in host plants, promoting physiological and biochemical benefits. Some endophytes synthesize and metabolize volatile organic compounds (VOCs), with potential biotechnological applications in agriculture, industry, and medicine. This study evaluated the interaction of the isolates *Paraconiothyrium estuarinum* and *Paraconiothyrium cyclothyrioides*, both from grasses, on the modulation of arbutin, physiological parameters, and the volatile compound profile of marjoram (*Origanum majorana*). Marjoram seedlings, obtained by tissue culture, were acclimatized and inoculated with fungal extracts (obtained by cultivating the endophytes in BD (potato + dextrose) medium). This inoculation occurred at the time of transplantation into pots containing commercial substrate, where the seedlings were grown in a greenhouse for ninety days. Arbutin quantification was performed by high-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector (HPLC-DAD). The results indicate that the endophytes significantly influenced the physiological characteristics and arbutin content. *P. estuarinum* (CML 3699) and *P. cyclothyrioides* (CML 3697) provided an increase of up to 11% in chlorophyll content and increases in dry biomass of 30% and 21%, respectively, compared to the lowest-performing isolate. *P. estuarinum* (CML 3695) modulated the production of *o*-cymene and linalool, while *P. cyclothyrioides* (CML 3698) provided an 8% increase in arbutin content compared to uninoculated plants. These results suggest that *Paraconiothyrium* spp. have the potential to elicit essential metabolic pathways in marjoram, promoting gains in the evaluated physiological characteristics and in the modulation of the plant's phytochemical profile.

Keywords: Endophytic fungi; *Paraconiothyrium estuarinum*; *Paraconiothyrium cyclothyrioides*; gas chromatography; *Origanum majorana*; tissue culture.

1 INTRODUÇÃO

A manjerona (*Origanum majorana*), pertencente à família Lamiaceae, é uma planta aromática originária da região mediterrânea, muito cultivada em diversas partes do mundo, incluindo Marrocos, Egito, Tunísia, Argélia, Espanha e Portugal (Bina et al., 2017). Utilizada na medicina tradicional, apresenta propriedades terapêuticas para o tratamento de distúrbios como gripe, febre, alergias, hipertensão, infecções respiratórias e dores reumáticas (Erenler et al., 2016).

É uma espécie perene, de porte arbustivo, que pode atingir entre 30 e 60 cm de altura. O perfil fitoquímico desta planta inclui compostos bioativos como timol, carvacrol, taninos, hidroquinona, arbutina, metilarbutina, vitexina, orientina, timonina e diversos flavonoides, como diosmetina e luteolina (Bouyahya et al., 2021). Entre esses compostos, destaca-se a arbutina, de grande interesse para a indústria farmacêutica e cosmética devido à sua capacidade de inibir a produção de melanina e atuar como agente clareador da pele (Boo, 2021). Além disso, a arbutina possui propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, sendo estudada também pelo seu potencial anticancerígeno (Nahar et al., 2022). Os microrganismos endofíticos são conhecidos por sintetizar metabólitos bioativos com aplicações biotecnológicas nas indústrias farmacêutica, alimentícia e agrícola (Pardo et al., 2022). Dentre esses, os fungos endofíticos podem produzir compostos orgânicos voláteis (COVs), que desempenham papéis essenciais na defesa contra patógenos e na promoção do crescimento vegetal (Werner et al., 2016).

Os endofíticos colonizam o interior das plantas sem causar danos, promovendo benefícios ao hospedeiro (Azevedo et al., 1998). Alguns são capazes de sintetizar metabólitos secundários semelhantes aos da planta hospedeira por meio de vias bioquímicas comuns, potencialmente adquiridas por transferência horizontal de genes (Tan et al., 2001). Essa capacidade pode influenciar a biossíntese e o acúmulo de compostos de interesse econômico, como observado em diversas espécies medicinais (Peixoto et al., 2004).

A descoberta de que fungos endofíticos podem produzir metabólitos bioativos semelhantes aos da planta hospedeira gerou grande interesse na bioprospecção desses organismos. Um exemplo clássico é o estudo de Stierle et al. (1993), que identificou o fungo *Taxomyces andreanae*, capaz de produzir o diterpenóide taxol, originalmente isolado da planta *Taxus brevifolia*. Fungos do gênero *Paraconiothyrium*, isolados de *Taxus* spp., também demonstraram a capacidade de aumentar a produção de taxol quando co-cultivados com

Alternaria e *Phomopsis* (Soliman e Raizada, 2013). A utilização de microrganismos endofíticos para modular a biossíntese de metabólitos secundários representa uma alternativa sustentável para a produção de compostos bioativos, podendo reduzir a dependência da extração de plantas raras ou de crescimento lento (Aly et al., 2010).

A concentração de arbutina em manjerona pode variar entre 0,2% e 11,8%, dependendo da origem geográfica, das condições ambientais e dos métodos de processamento da planta (CALA, 2021; Lukas et al., 2010). Estudos indicam que fatores como estresse hídrico e o método de secagem podem influenciar diretamente o teor desse composto (Migas & Krauze-Baranowska, 2015).

Diante desse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da inoculação de fungos endofíticos do gênero *Paraconiothyrium* em plantas de manjerona, investigando sua influência nos parâmetros fisiológicos, no crescimento e no teor de arbutina, além da caracterização dos compostos voláteis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais. As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica e Controle de Qualidade Plantas Medicinais pertencentes ao Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras – Lavras – MG. Os exemplares de *Origanum majorana* foram obtidas do Horto Medicinal UFLA sobre a exsicata de nº 58.898 do Herbário PAMG da Empresa de Pesquisas Agropecuárias de Minas Gerais (EPAMIG), Belo Horizonte-MG. Os isolados de *Paraconiothyrium* foram cultivados no BIOGEN (Laboratório de Bioprospecção e Genética de Fungos Filamentosos) localizado no Departamento de Microbiologia Agrícola.

2.1 Estabelecimento “in vitro” das mudas

Para assegurar a obtenção de mudas isentas de contaminações externas e garantir a confiabilidade dos resultados experimentais, foi utilizado o cultivo *in vitro* de *Origanum majorana*. A adoção da cultura de tecidos vegetais permitiu o controle rigoroso das condições de assepsia, eliminando a presença de microrganismos endófitos não intencionais e de eventuais patógenos associados ao material vegetal. Esse procedimento foi fundamental para garantir que as respostas observadas nos ensaios fossem atribuídas exclusivamente aos microrganismos inoculados experimentalmente.

Segmentos nodais (± 1 cm) de *Origanum majorana* foram utilizados como explantes.

Inicialmente, os explantes foram lavados com detergente neutro e enxaguados em água corrente. Em seguida, foi realizada a desinfestação superficial com hipoclorito de sódio a 50% (v/v) por 15 minutos, seguida de três lavagens com água deionizada esterilizada. Após a remoção das folhas, os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS/2 (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e 5,5 g L⁻¹ de ágar (pH 5,7 ± 0,1). Os explantes foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 1°C e irradiância de 32 μmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas de LED.

2.2 Indução de enraizamento

Segmentos apicais, provenientes de mudas já estabelecidas *in vitro*, com um par de folhas, foram inoculadas em frascos com capacidade para 200 mL com 40 mL de meio de cultura MS/2 (M5519, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) (Murashige e Skoog, 1962) e um sistema de membrana alternativo constituído por quatro membranas porosas (AMS4), suplementados com 15 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar (Himedia®, tipo I), e 1,0 mg L⁻¹ de AIB, pH ajustado para 5,7±0,1. Inicialmente, os frascos com os meios de cultura foram autoclavados a 125°C e 1,2 atm de pressão por 20 min.

Após a inoculação, os recipientes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±1°C, e uma irradiância de 42 μmol m⁻²s⁻¹ fornecida artificialmente por lâmpadas de diodos emissores de luz (LEDs) (TECNAL©Piracicaba, Brasil).

2.3 Cultivo dos Fungos endofíticos

Cinco fungos do gênero *Paraconiothyrium* foram isolados de colmos de gramíneas forrageiras pertencentes às espécies *Megathyrus maximus* (Jacq.) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs e *Brachiaria* spp., conforme descrito por Maia et al. (2018) e Gama et al. (2020). As espécies *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3695, CML 3696 e CML 3699) e *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3697 e CML 3698) foram identificadas morfológicamente e molecularmente por Alves et al. (2021). Os fungos estão depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML), Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLLA). Para manutenção, os isolados foram armazenados em água Milli-Q autoclavada, seguindo o protocolo de conservação de Castellani (1964), sob refrigeração a 4 °C. A cada ciclo experimental, os microrganismos foram reativados em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e incubados a 25 °C por sete dias. Após crescimento das colônias, discos de 5 mm foram transferidos para 200 mL de meio Batata-dextrose (BD) e incubados a 25 °C, sob agitação a

100 rpm por 14 dias. O micélio e esporos foram usados na inoculação das mudas de manjerona.

2.4 Aclimatização das mudas e inoculação com fungos endofíticos

Após 30 dias de desenvolvimento *in vitro*, as mudas de *Origanum majorana* foram transplantadas para bandejas de poliestireno com 128 células, utilizando como substrato o composto comercial Tropstrato® HA para hortaliças. As plantas permaneceram em fase de aclimatização por 20 dias, sob condições controladas em casa de vegetação. Antes dos transplantes das mudas para as bandejas foi realizado o isolamento microbiológico a partir de fragmentos foliares e radiculares, cultivados em meio de batata-dextrose-ágar (BDA), com o objetivo de confirmar a ausência de microrganismos nativos ou contaminantes nas mudas utilizadas.

Concluído o período de aclimatização, as mudas foram transplantadas para vasos de 3 litros contendo o mesmo substrato utilizado nas bandejas. A inoculação com os fungos endofíticos foi realizada aos 20 dias após o plantio (DAP), por meio da aplicação de 10 mL da suspensão fúngica diretamente no substrato, próximo à base da planta (Figura 1). Durante esse período, a irrigação foi realizada manualmente, com aplicação diária de 20 mL de água por vaso, garantindo umidade adequada ao substrato.

Para favorecer a colonização endofítica, foram realizadas três aplicações foliares da suspensão fúngica, iniciadas aos 30 dias após o plantio (DAP), com intervalos de 15 dias entre as pulverizações. Cada planta recebeu um volume de 10 mL da suspensão fúngica até o ponto de escoamento. Imediatamente após cada aplicação, as plantas foram acondicionadas em câmaras úmidas por 24 horas, com o objetivo de aumentar a permeabilidade dos tecidos e facilitar a entrada dos microrganismos. Além disso, uma única adubação foi realizada aos 15 DAP, por meio da aplicação direta de solução nutritiva (N-P-K) no substrato. A Figura 1 ilustra os métodos empregados para a inoculação dos fungos endofíticos em *Origanum majorana*.

2.5 Avaliações fisiológicas

As avaliações ocorreram aos 90 dias após o plantio (DAP), período correspondente ao pleno desenvolvimento vegetativo das plantas de *Origanum majorana*.

Figura 1- Inoculação dos endofíticos nas mudas de manjerona: Inoculação via sulco (A); Pulverização foliar com o extrato fúngico (B); câmara úmida (C).



Foto: elaboração própria

Normalized Difference Vegetation Index (NDVI)

O NDVI foi realizado por meio de um sensor proximal portátil Greenseeker® (Trimble), que emite radiação eletromagnética nas faixas do vermelho visível (RED, 650nm) e do infravermelho próximo (NIR, 770 nm). As medições foram realizadas nas três folhas superiores da haste principal, a uma altura aproximada de 60 cm da base da planta. A leitura da reflectância em ambas as bandas é processada por um microcontrolador interno que calcula o índice com base nas diferenças de absorção e reflexão da luz pelas folhas das plantas, diretamente relacionadas ao conteúdo de clorofila e ao estado fisiológico do dossel vegetal.

O NDVI foi determinado utilizando a equação proposta por Rouse et al. (1974):

Equação 1:

$$NDVI = (NIR - RED) / (NIR + RED)$$

Esse índice, de natureza adimensional, varia de 0,00 a 0,99, sendo amplamente empregado para estimar o vigor vegetativo, a biomassa fotossintética e a eficiência na interceptação de luz. Valores mais elevados de NDVI indicam maior atividade fotossintética e cobertura vegetal densa, enquanto valores mais baixos são associados a estresse fisiológico ou deficiência nutricional, sobretudo de nitrogênio (Freeman et al., 2007; Crain et al., 2012).

Índice de Clorofila Falker (ICF)

A estimativa não destrutiva do teor relativo de clorofila nas folhas foi realizada com o auxílio do equipamento ClorofiLOG®, modelo CFL 1030 (Falker). Este sensor portátil nacional opera com base na reflectância da luz em três diferentes comprimentos de onda, permitindo inferir a densidade de pigmentos fotossintéticos presentes no tecido foliar.

A partir da relação entre as intensidades de luz refletida e absorvida nas bandas espectrais utilizadas, o equipamento gera um valor numérico denominado Índice de Clorofila

Falker (ICF), que representa de forma integrada os teores das clorofilas a e b. Esse índice é amplamente utilizado como indicativo da condição fisiológica da planta, especialmente no que se refere à capacidade fotossintética e ao status nutricional, em particular à disponibilidade de nitrogênio nas folhas, (Falker, 2008). As medições foram realizadas em folhas completamente expandidas, situadas na porção mediana das plantas, com três leituras por planta. Os valores foram expressos em unidades relativas de ICF.

Produção de matéria seca

A biomassa seca foi determinada separadamente para folhas, caules e raízes. Após a coleta, os tecidos foram lavados, identificados e colocados em sacos de papel, sendo posteriormente submetidos à secagem em estufa com circulação de ar forçada a 45 °C, até atingirem peso constante. Os valores de biomassa seca foram expressos em gramas por planta (g planta^{-1}). A análise individualizada dos órgãos vegetativos (folha, caule e raiz) permitiu identificar alterações específicas no padrão de alocação de biomassa, refletindo os efeitos dos tratamentos com fungos endofíticos na morfologia e metabolismo das plantas. A biomassa total foi obtida pela soma das massas secas dos três órgãos analisados.

ANÁLISES DA ARBUTINA

Preparo da amostra

A extração da arbutina a partir das folhas desidratadas de *Origanum majorana* seguiu a metodologia de Cossa et al., 2024, com pequenas modificações. Utilizou-se alíquotas de 250 mg de folhas secas pulverizadas de *Origanum majorana* que foram extraídas por sonicação, empregando dois ciclos de 10 minutos com 7 mL de solução hidrometanólica a 50% em cada ciclo. Após cada ciclo de sonicação, o extrato foi filtrado à vácuo, reunido e homogeneizado. Após reunir o volume de dois ciclos, estes foram reunidos em balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com a solução hidrometanólica a 50%. Em seguida, uma alíquota de 5 mL foi evaporada sob vácuo em um evaporador rotativo a cerca de 40 °C. O resíduo seco foi solubilizado em 1.000 μL de água ultrapura (H_2O). As amostras foram transferidas para um microtubo e submetidas à sonicação por 2 minutos, seguida de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi injetado automaticamente no cromatógrafo.

Condições cromatográficas

As condições analíticas nas análises por CLAE-DAD seguiu a metodologia descrita por

Cossa et al (2024), a qual empregou um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), modelo Agilent 1200 (Agilent Technologies®, Waldbronn, Alemanha), equipado com uma bomba quaternária (G1311A), sistema de desgaseificação (G13222A), amostrador automático ALS (G1322A), aquecedor TCC (G1316A) e detector ultravioleta de comprimento de onda variável (G1315D), para obter-se cromatogramas a 220 nm. O controle do equipamento foi realizado por meio do *software* OpenLAB, versão A07.04, build 04.07.28.

As separações foram realizadas em uma coluna analítica de fase reversa C18 (Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies®, EUA) com um empacotamento à base de sílica (250 mm × 4,6 mm d.i., 5 µm) e pré-coluna (12,5 mm × 4,6 mm d.i., 5 µm). Um volume de 10 µL das amostras foi injetado na coluna com temperatura do forno mantida a 25°C e uma taxa de fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. Utilizou-se água ultrapura (A) e metanol (B) como eluentes. O programa de eluição foi o seguinte: 10% B em condição isocrática de 0-5 min, seguido de gradiente linear até 95% B por 5 min, mantendo-se em condição isocrática por mais 5 min, retornando à condição inicial em gradiente linear reverso por 5 min, totalizando 20 minutos de análise, seguido por um período de equilíbrio de 10 min.

Caracterização e quantificação

A presença da arbutina nas amostras foi realizada por meio de comparação de tempos de retenção, espectros no UV e co-injeção com arbutina de referência. A quantificação da arbutina no extrato de *Origanum majorana* foi feita pelo método do padrão externo (Ribani et al., 2004). Para a construção das curvas analíticas a faixa de concentração da arbutina foi mensurada a partir das áreas relativas do pico de interesse nas amostras e a partir de uma solução de referência com concentração de 2,0 mg mL⁻¹.

A linearidade do método foi determinada a partir de três curvas analíticas construídas com cinco pontos em dias diferentes. Cada ponto das curvas foi obtido por injeção em triplicata da solução de referência de arbutina. As curvas analíticas foram determinadas em relação a massa injetada (µg) de arbutina.

Os dados obtidos para cada curva analítica foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação (R²) correspondentes foram calculados. As curvas obtidas nos três dias consecutivos foram comparadas estatisticamente por análise de covariância (p<0,05) no *software* Graph Pad Prism 6. Comparada a similaridade estatística das curvas, empregou-se determinou-se a curva analítica média. As amostras foram analisadas em triplicata e os teores expressos em mg por

grama de extrato (mg g^{-1}).

Fração volátil de *Origanum majorana*

Amostras de 60 mg de folhas secas, em triplicatas, foram acondicionadas em vial para headspace de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE até a análise. Em seguida, os *vials* foram transferidos para o extrator *headspace* automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM (Cromatógrafo Gasoso/Espectrômetro de Massa). As amostras foram incubadas por 30 min a 110 °C, com agitação a 250 rpm e a temperatura da seringa foi programada para 120 °C e o volume de injeção de 500 $\mu\text{L/s}$ da fase de vapor, injetados em modo *split* na razão 10:1.

Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL min^{-1} ; as temperaturas do injetor foram mantidas em 250 °C e da linha de transferência 280 °C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 240 °C, seguida de uma rampa de 10 °C min^{-1} até 280 °C. As concentrações dos constituintes presentes na fração volátil foram calculadas através da área integral de seus respectivos picos, relacionando a área total de todos os picos.

Os compostos químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) e de literatura (Adams, 2017; NIST, 2025). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As mudas produzidas *in vitro* apresentaram 100% de sobrevivência e não houve contaminações microbianas visíveis e o isolamento microbiológico apresetou resultados negativos para fungos e bactérias. A adição de 1,0 mg L^{-1} de ácido indolbutírico (AIB) ao meio de enraizamento foi eficiente na indução da rizogênese, resultando na formação de raízes em todos os explantes tratados. No processo subsequente de aclimatização, as plantas

mantiveram elevados índices de vigor, sem perdas, e apresentaram plena adaptação às condições ambientais da casa de vegetação. Após o transplante para vasos obteve-se 100% de pegamento, com manutenção da sanidade das plantas ao longo do ciclo experimental.

A associação dos fungos endofíticos resultou em diferentes respostas morfofisiológicas e metabólicas nas plantas de manjerona, as quais variaram conforme a cepa inoculada. Foram avaliadas variáveis relacionadas ao desenvolvimento vegetativo, aos parâmetros fisiológicos (índice de vegetação, clorofila) e à composição metabólica (teores de arbutina e composição dos compostos orgânicos voláteis). Os dados obtidos indicam que a interação planta-endofítico pode modular significativamente rotas metabólicas específicas, com implicações diretas na qualidade fitoquímica e no desempenho agrônômico da espécie.

4.1 Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI)

No presente trabalho, os valores de NDVI variaram entre 0,46 e 0,49, situando-se acima do limiar de 0,4 proposto por Gitelson et al. (2003), que caracteriza vegetação saudável (Tabela 1). Esses resultados indicam que as plantas, independentemente da inoculação com os fungos endofíticos do gênero *Paraconiothyrium*, apresentaram vigor vegetativo satisfatório. A ausência de diferenças estatísticas entre os tratamentos sugere que, nas condições experimentais adotadas, não houve variações significativas no acúmulo de biomassa fotossinteticamente ativa. O Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI) é amplamente utilizado como indicador do status fisiológico das plantas, refletindo a densidade da vegetação verde, a eficiência da fotossíntese e, indiretamente, a absorção de nutrientes, especialmente o nitrogênio (Tucker, 1979; Gitelson et al., 2003). Este índice é obtido a partir da diferença entre a reflectância da radiação no infravermelho próximo (NIR) e no vermelho (RED), sendo altamente correlacionado à teor de clorofila e ao conteúdo de biomassa da parte aérea da planta (Freeman et al., 2007).

Além disso, estudos como os de Argenta et al. (2001) indicam que, em situações de boa disponibilidade de nitrogênio no solo, o NDVI tende a estabilizar em patamares elevados, refletindo o pleno potencial fotossintético das plantas.

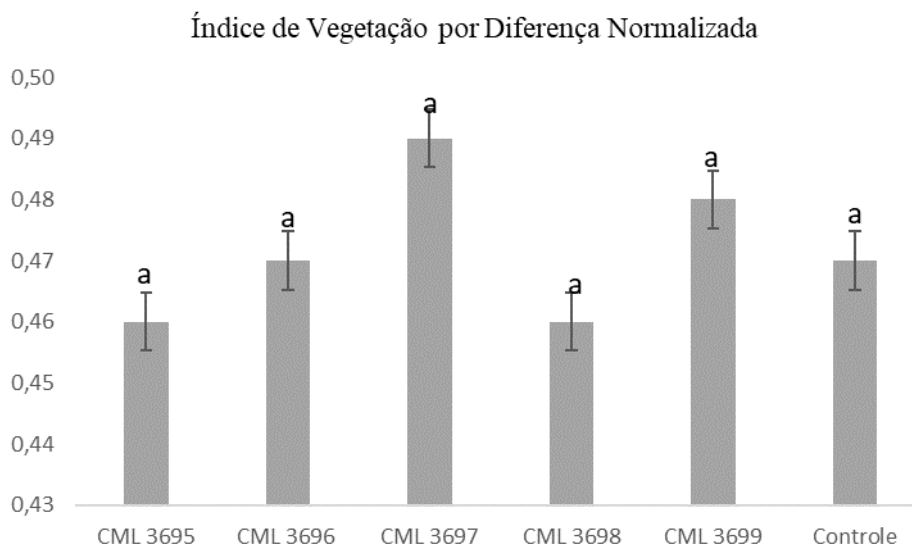
Tabela 1 - Índice de Vegetação por Diferença Normalizada Clorofila (A, B, Total) em plantas de *Origanum majorana* inoculadas com *Paraconiothyrium* spp.

Tratamento	NDVI	Cl a	Cl b	Cl total
CML 3695	0,46 a	32,84 b	35,5 b	36,12 a
CML 3696	0,47 a	39,68 b	39,46 b	35,95 a
CML 3697	0,49 a	42,14 a	44,57 a	39,95 a
CML 3698	0,46 a	36,60 b	34,90 b	36,26 a
CML 3699	0,48 a	41,95 a	41,79 a	41,78 a
Controle	0,47 a	37,84 b	37,91 b	41,01 a

Índice de vegetação normalizada (NDVI); Clorofila A (Cl a) Clorofila B (Cl b); Clorofila total (Cl total); Médias seguidas pelas mesmas letras nas mesmas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

Resultados semelhantes foram relatados por Molin et al. (2010), que não observaram variação no NDVI em diferentes fases do ciclo da cana-de-açúcar, devido à baixa demanda inicial de nitrogênio e à interferência do solo sobre a resposta espectral das plantas. Assim, é possível que o tempo de avaliação, os níveis de fertilidade e a estabilidade ambiental tenham limitado a expressão fenotípica diferenciada entre os tratamentos, mascarando os possíveis efeitos da inoculação endofítica sobre esse parâmetro.

Figura 1 – Gráfico dos valores médios do Índice de Vegetação por Diferença Normalizada em plantas de *Origanum majorana* inoculadas com *Paraconiothyrium* spp.



4.2 Índice de Clorofila Falker (ICF)

Os teores de clorofila são marcadores fisiológicos diretamente associados à capacidade fotossintética da planta, refletindo o estado nutricional e a eficiência da interceptação da luz solar. A clorofila *a* é o principal pigmento envolvido na captação de fótons, enquanto a clorofila

b atua como pigmento acessório, expandindo o espectro de absorção da luz e estabilizando os complexos do fotossistema II (Taiz et al., 2017; Lichtenthaler et al., 2005).

Variação significativa foi observada nos teores de clorofila *a*, *b* e total (Tabela 1) das plantas inoculadas com os fungos endofíticos, indicando efeito dos fungos na composição pigmentária das plantas de manjerona. *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3697) e *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3699) proporcionaram maiores teores de clorofila *a* (42,14 e 41,95), clorofila *b* (44,57 e 41,79) e clorofila total (39,95 e 41,78), respectivamente (Tabela 1). Esses resultados sugerem que os endofíticos contribuíram para a manutenção ou estímulo da atividade fotossintética, possivelmente por mecanismos de regulação hormonal, aumento da absorção de nutrientes ou modulação do estresse oxidativo, conforme relatado por Santoyo et al. (2016) e Kumar et al. (2021).

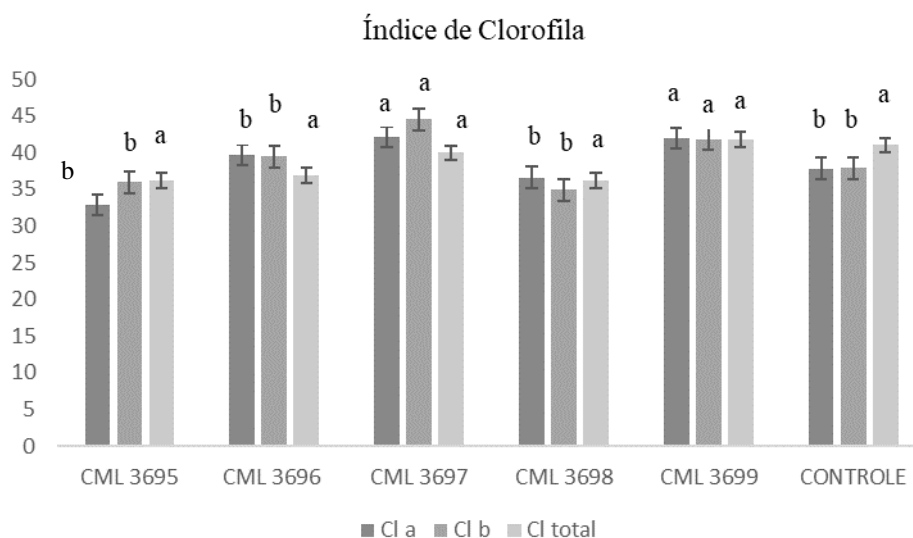
O aumento nos teores de clorofila nas plantas inoculadas com *P. cyclothyrioides* (CML 3697), está diretamente relacionado a um maior acúmulo de biomassa seca nas folhas e caule, demonstrando um desempenho fisiológico superior, coerente com maior eficiência na conversão de energia luminosa em biomassa estrutural. A clorofila atua como fator limitante à fotossíntese sob condições ambientais não limitantes, sendo sua concentração positivamente relacionada ao acúmulo de fotoassimilados (Farquhar et al., 1980).

Paraconiothyrium estuarinum (CML 3695) apresentou menores teores médios de clorofila *a*, *b* e total (32,84; 35,93 e 36,12, respectivamente) indicando uma menor atividade fotossintética no momento da avaliação ou uma redistribuição metabólica de recursos para outras rotas secundárias, como a biossíntese de compostos voláteis. Em interações planta-microrganismo, é possível que alguns endofíticos não influenciam diretamente na taxa fotossintética, mas estimulem rotas associadas à defesa química ou adaptação metabólica (Kusari et al., 2012; Bitas et al., 2013). Além disso, a redução nos pigmentos fotossintéticos também pode estar associada à regulação por feedback negativo induzida por sinais moleculares, sem necessariamente representar estresse fisiológico ou desvantagem adaptativa. Segundo Rodrigues (1999), respostas diferenciadas na fisiologia da planta podem ocorrer mesmo em interações benéficas, sendo resultado da complexa sinalização entre hospedeiro e microrganismo. Portanto, a menor concentração de clorofila observada para *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3695) deve ser interpretada dentro de um contexto funcional mais amplo, considerando os efeitos positivos verificados em outras variáveis do experimento (Figura 2).

É importante destacar que cada microrganismo endofítico pode induzir uma resposta específica na planta hospedeira e a seleção de inoculantes deve ser criteriosa quando o objetivo

é a promoção do crescimento vegetativo (Verma et al., 2019).

Figura 2 – Gráfico dos valores médios do Índice de Clorofila em plantas de *Origanum majorana* inoculadas com *Paraconiothyrium* spp



4.3 Produção de matéria seca

Houve diferenças significativas do acúmulo de matéria seca nas plantas de manjerona associadas aos fungos endofíticos (Tabela 2). A inoculação de *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3699) e *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3697) proporcionaram maiores incrementos de biomassa seca foliar das plantas de manjerona, apesar de não diferiram significativamente das plantas controle. Plantas inoculadas com *P. estuarinum* (CML 3699) e *P. cyclothyrioides* (CML 3697) apresentaram 30% e 21% respectivamente a mais na matéria seca que plantas inoculadas com *P. estuarinum* (CML 3695) indicando maior eficiência na assimilação de carbono em condições de estresse (Bashan et al., 2004).

Tabela 2 - Índice de Vegetação por Diferença Normalizada Clorofila (A, B, Total) em plantas de *Origanum majorana* inoculadas com *Paraconiothyrium* spp.

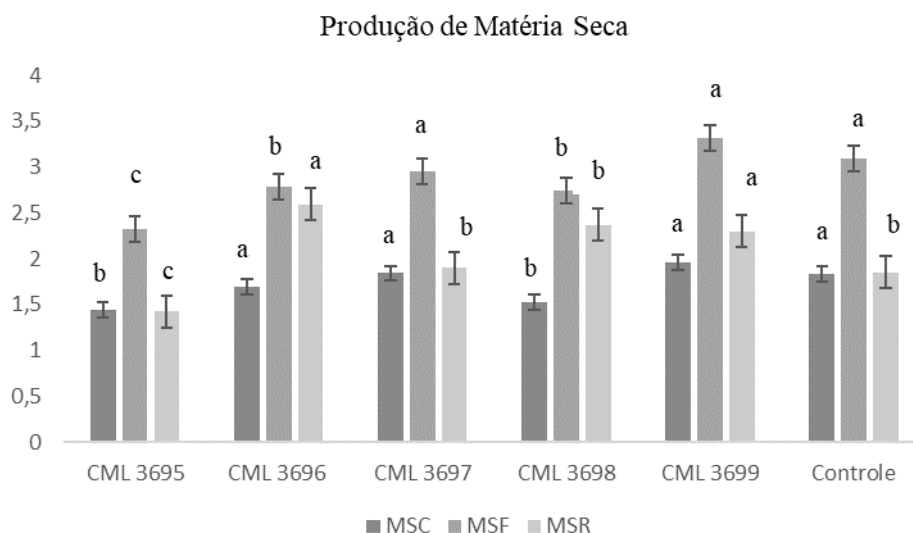
TRATAMENTO	MSF	MSC	MSR
CML 3695	2,32 a	1,44 b	1,42 c
CML3696	2,78 b	1,69 a	2,59 a
CML3697	2,95 a	1,84 a	1,90 b
CML3698	2,74 b	1,53 b	2,37 a
CML 3699	3,31 a	1,96 a	2,30 a
Controle	3,09 a	1,83 a	1,85 b

Matéria seca da folha (MSF); Matéria seca do caule (MSC); Matéria seca da raiz (MSR). Médias seguidas pelas mesmas letras nas mesmas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

A matéria seca do caule das plantas de manjerona associadas aos fungos endofíticos *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3696 e CML 3697) e *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3699) não diferiram estatisticamente das plantas não inoculadas. O crescimento do caule pode ser impulsionado por hormônios vegetais como giberelinas e auxinas, muitas vezes regulados por microrganismos endofíticos (Vacheron et al., 2013). O desenvolvimento do caule também pode estar relacionado à eficiência na absorção de água e nutrientes via raízes, afetando diretamente a robustez da planta (Rodriguez et al., 2009).

A matéria seca da raiz foi significativamente aumentada nas plantas inoculadas com *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3696 e 3698) e *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3699) comparado às plantas controle. Fungos endofíticos podem sintetizar ou induzir as plantas a um aumento na síntese de auxinas, citocininas e giberelinas, que regulam a divisão celular, alongamento de raízes e diferenciação de tecidos e, isto pode explicar as diferenças observadas (Figura 3).

Figura 3 - Produção de matéria seca do caule, foliar e da raiz de plantas de *Origanum majorana* inoculadas com *Paraconiothyrium* spp



Penicillium paxilli, por exemplo, secreta ácido indolacético (AIA) em concentrações que estimulam a formação de raízes laterais em *Euterpe precatoria*, aumentando a absorção de água e nutrientes (Prado, 2020). O crescimento das raízes é um dos principais fatores associados ao sucesso dos inoculantes, pois pode ser estimulado por bactérias e fungos endofíticos que aumentam a disponibilidade de fósforo e regulam a biossíntese de hormônios como auxinas (Souza et al., 2015). Um sistema radicular mais robusto melhora a capacidade de absorção de água e nutrientes, impactando diretamente a tolerância ao estresse e o rendimento da cultura (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Esses achados estão alinhados com estudos que demonstraram que fungos endofíticos

podem promover o crescimento vegetal por meio da produção de fitohormônios, aumento da absorção de nutrientes e ativação de mecanismos de defesa. Azevedo et al, (2021) observaram que isolados de *Paraconiothyrium estuarinum* e *Paraconiothyrium cyclothyrioides* promoveram o crescimento de *Brachiaria* spp. e *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs, o que impactou no ganho de biomassa e no acúmulo de clorofila, corroborando com os resultados do presente estudo.

Segundo Ahemad et al., (2014), microrganismos endofíticos podem aumentar a eficiência fotossintética ao modular a biossíntese de clorofila e a atividade do fotossistema. Esses efeitos são atribuídos à produção de auxinas, citocininas e sideróforos, que regulam o metabolismo vegetal e melhoram a absorção de ferro, elemento essencial para a síntese de clorofila. No presente estudo, a maior produção de biomassa nos tratamentos com *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3697 e CML 3698) pode estar associada a um aumento na disponibilidade de auxinas.

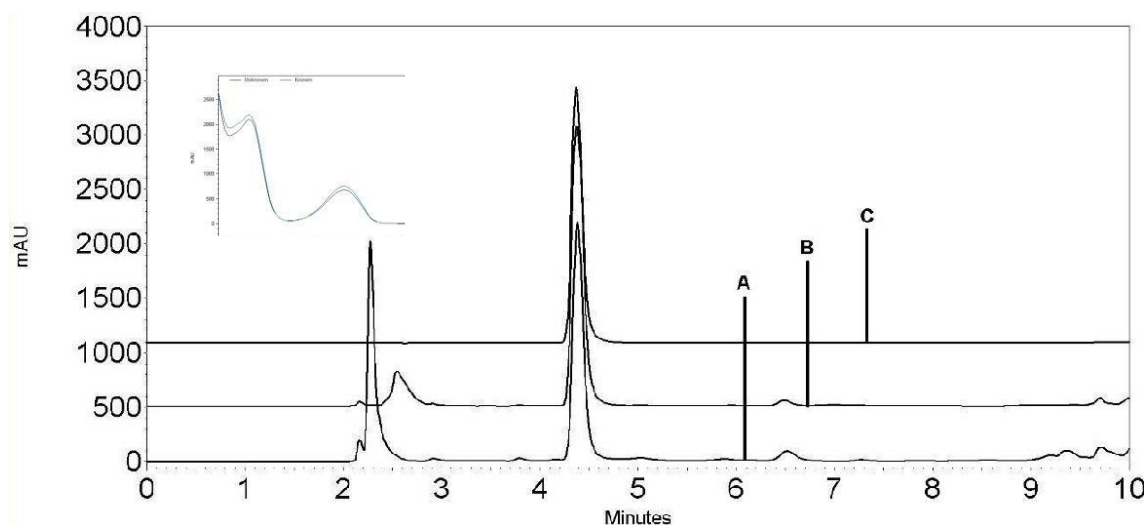
Portanto, embora o NDVI não tenha evidenciado diferenças entre os tratamentos, os resultados indicam que o *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3697) e *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3699) promoveram um impacto positivo na capacidade fotossintética e no acúmulo de biomassa, refletido no aumento da clorofila e da matéria seca das folhas e do caule.

4.4 Análises da arbutina

A caracterização da arbutina por CLAE-DAD foi realizada a partir da comparação dos tempos de retenção, espectros no UV e co-injeção com padrão. A Figura 4 ilustra a presença de arbutina na amostra pela sobreposição dos tempos de retenção da amostra, da co-injeção e do padrão de arbutina em 4,20 min. O pico correspondente a arbutina na amostra apresentou homogeneidade espectral com o espectro do pico do padrão, caracterizando a presença da arbutina e atestando a seletividade do método.

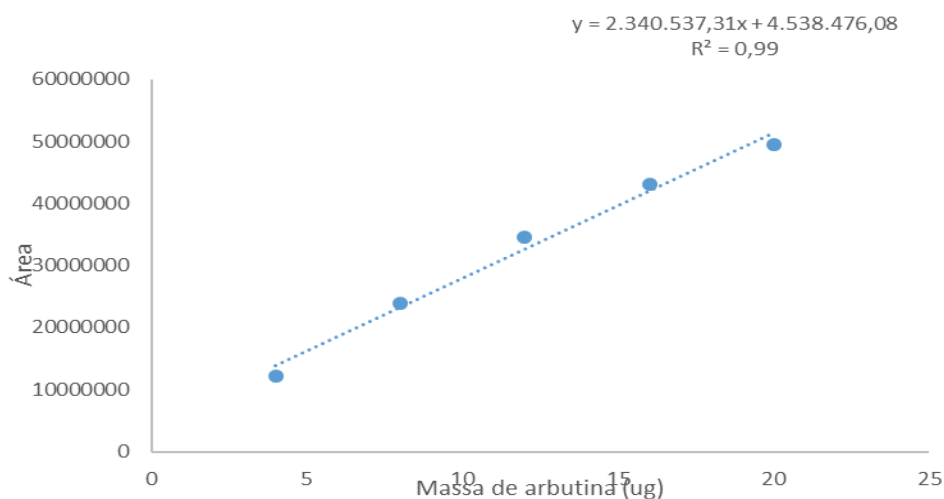
A curva média obtida de três curvas analíticas estatisticamente iguais ($p > 0,05$) está representada na Figura 5, a qual foi construída com base nas massas injetadas (2 a 16 μg) de uma solução de referência de arbutina versus a área de pico. A curva compara a linearidade do método com um R^2 de 0,99 para a equação de regressão média ($y = 2340537x + 4538476$).

Figura 4 - Perfis cromatográficos do extrato de folhas secas de *Origanum majorana*, obtido por HPLC- DAD.



a: amostra; b: co-injeção da amostra com o padrão de arbutina; c: padrão de arbutina, no tempo de retenção de 4,2 min. Os espectros no UV foram obtidos on-line pelo detector DAD para a amostra.

Figura 5 - Média das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD, em três dias consecutivos, para arbutina nas amostras de *Origanum majorana*, comprimento de detecção (220 nm), $R^2 = 0,9900$.



Fonte: elaboração própria

O teor de arbutina foi influenciado positivamente pela associação dos fungos *Paraconiothyrium* em plantas de *Origanum majorana* (Tabela 3). *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3698) proporcionou o maior incremento do teor de arbutina de 8% superando os valores observados nas plantas controles indicando que a interação planta-microrganismo pode modular a biossíntese de metabólitos secundários.

De maneira similar, Soares et al. (2017) demonstraram que a inoculação de *Chaetomium globosum* em *Hypericum perforatum* elevou em três vezes a produção de hipericina, um metabólito de interesse farmacológico. Esses achados corroboram a hipótese de que fungos endofíticos podem ativar vias biossintéticas por meio de interações bioquímicas e sinalização molecular.

Tabela 3 – Teores de arbutina (Arb mg g⁻¹) em plantas de *Origanum majorana* inoculadas com *Paraconiothyrium* spp.

TRATAMENTO mg g⁻¹)	
CML 3695	3,38 e
CML3696	4,56 c
CML3697	4,39 d
CML3698	5,30 a
CML 3699	4,87 b
Controle	4,89 b

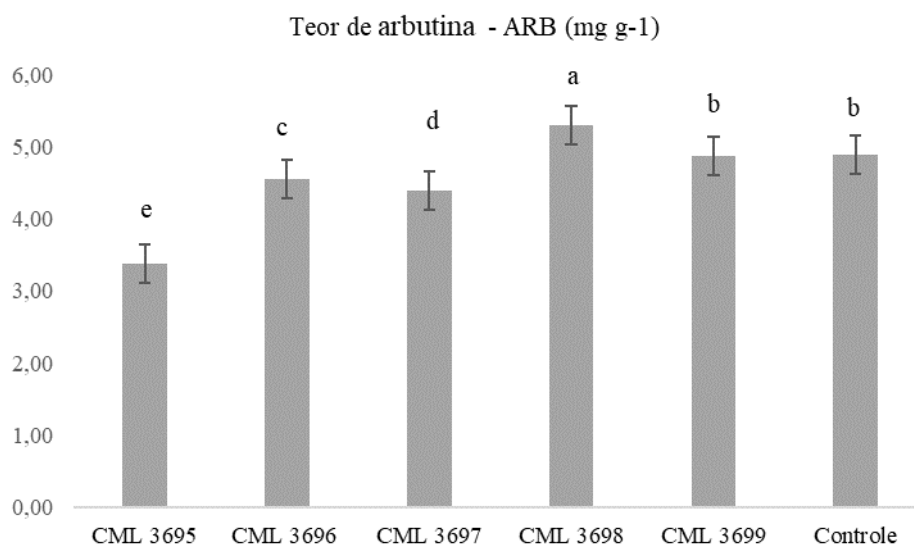
Teor de arbutina (Arb mg g⁻¹). Médias seguidas pelas mesmas letras nas mesmas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Em estudos do nosso grupo foram observadas concentrações de arbutina de 11,8 a 13,0 mg/g de peso seco de folhas de plântulas de *Origanum majorana* submetida a diferentes regimes de luz, doses de sacarose e sistema de ventilação natural (Cossa *et al.*, 2024a; Cossa *et al.*, 2024b). No entanto, em cultivo em casa de vegetação com os fungos endofíticos *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3695 e CML 3699) e *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3696, CML 3697 e CML 3698) registrou concentrações de 3,38 a 5,30 mg/g de peso seco de folhas (Figura 6).

Conforme Pop et al. 2024, o teor de arbutina em plantas é dependente de diversos fatores, incluindo os estádios de desenvolvimento e a época de colheita e, portanto, as diferenças observadas podem estar relacionadas com os diferentes ambientes de cultivo, estádios de desenvolvimento e tempo de colheita.

No caso específico da arbutina, outros fatores como disponibilidade de precursores metabólicos, ativação de genes biossintéticos e interação com compostos orgânicos voláteis (COVs) podem estar envolvidos na sua acumulação. Trabalhos como os de Migas e Krauze-Baranowska (2015), demonstraram que a biossíntese de arbutina pode ser modulada por fatores ambientais e estresses abióticos, indicando que os COVs liberados pelos fungos podem atuar como indutores dessa via metabólica.

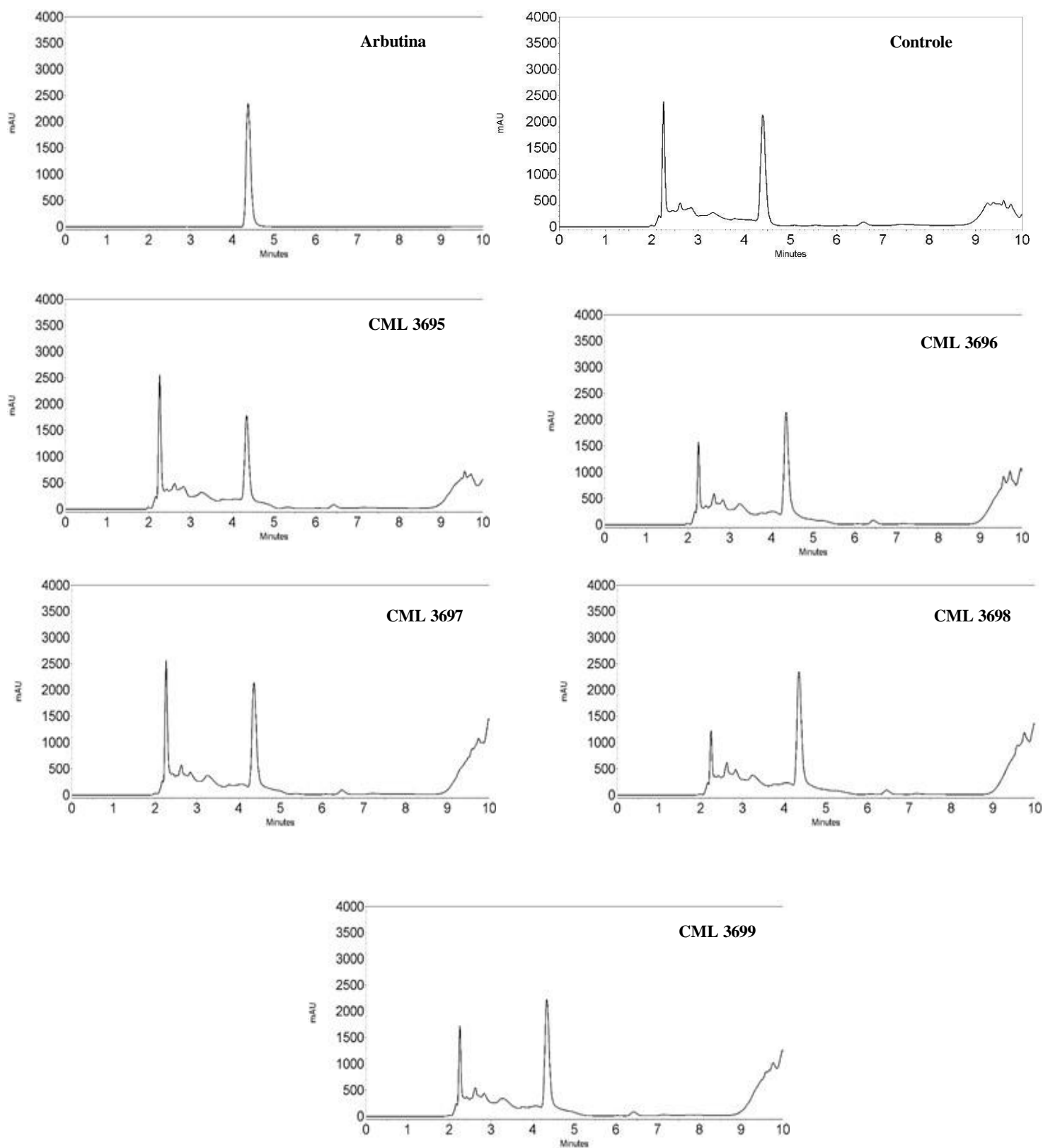
Figura 6 – Teores de arbutina (Arb mg g⁻¹) em plantas de *Origanum majorana* inoculadas com *Paraconiothyrium* spp.



No que tange aos resultados do presente estudo, apesar das diferenças nas concentrações de arbutina em folhas secas de manjerona, que podem ser atestadas nos cromatogramas da Figura 7 pelas intensidades dos picos cromatográficos referente a arbutina em 4,2 min nos diferentes tratamentos, as amostras registraram perfis químicos similares. Embora, nota-se também diferença nas áreas do pico registrado em 2,2 min (pico não identificado).

Condições de estresse ambientais mediam as relações simbióticas entre fungos endofíticos e a planta hospedeira, modulando a produção de metabólitos secundários nos endofíticos, ativando via bioquímicas de defesa, aumentando em até 80% a síntese de compostos bioativos sob condições adversas (Singh et al., 2023), oferecendo a perspectiva de um caminho sustentável para aumentar a produtividade sem pressionar os recursos naturais (Soares et al., 2017).

Figura 7 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para a arbutina de referência e para os extratos hidrometanólicos a 50% das folhas de *Origanum majorana* cultivada em casa de vegetação sem (controle) e com a inoculação com os fungos endofíticos *Paraconiothyrium estuarium* (CML 3695, CML 3696 e CML 3699) e *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3697 e CML 3698) para avaliação dos perfis químicos das amostras. Condições cromatográficas: vide parte experimental.



4.6 Análise da fração volátil de *Origanum majorana* associada a fungos endofíticos

A inoculação dos fungos do gênero *Paraconiothyrium* nas plantas de manjerona alteraram a área do pico de alguns compostos voláteis liberados nas folhas de manjerona. Ainda que o perfil qualitativo tenha permanecido semelhante entre os tratamentos, foram identificados 27 compostos voláteis comuns, representando entre 97,48% e 99,24% da composição total detectada por CG-EM utilizando a técnica de headspace estático.

Os monoterpenos hidrocarbonetos foram a classe predominante em todas as amostras, respondendo por 60,12% a 68,54% da fração total, com destaque para γ -terpineno (28,31–34,74%) e *o*-cimeno (7,53–22,57%). Já os monoterpenos oxigenados representaram entre 16,13% e 21,74%, sendo o α -terpineol o composto mais abundante dessa classe.

Variações expressivas foram observadas em três constituintes principais: *o*-cimeno, γ -terpineno e α -terpineol. O conteúdo de *o*-cimeno nas plantas inoculadas, atingiu 22,57% na associação com *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3695), quase três vezes mais que o valor observado no controle (7,53%). Essa elevação sugere que a inoculação com endofíticos favoreceu a conversão de γ -terpineno em *o*-cimeno, uma transformação que ocorre via desidrogenação e aromatização, como proposto por Kamitsou et al. (2014). A rota biossintética desses compostos origina-se da via do MEP (metileritritol fosfato), a qual produz os precursores IPP (isopentenil pirofosfato) e DMAPP (dimetilalil pirofosfato), levando à formação de γ -terpineno — este, por sua vez, é precursor direto de *p*-cimeno e seus isômeros, incluindo *o*-cimeno (Beekwilder et al., 2004; Dudareva et al., 2013).

O teor de γ -terpineno, foi semelhante nas plantas controles (34,4%) e nas plantas tratadas com *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3697) 34,74%, porém sofreu reduções graduais nos demais isolados, sugerindo que parte desse composto pode ter sido canalizado para a biossíntese de *o*-cimeno. Isso corrobora a hipótese de que os endofíticos podem atuar como eliciadores metabólicos, modulando vias específicas do metabolismo secundário (Kusari et al., 2012; Díaz et al., 2021).

O composto α -terpineol apresentou as maiores flutuações entre os tratamentos, com teor máximo de 13,25% no *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3698) e mínimo de 7,77% no *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3695). Como monoterpeno oxigenado, o α -terpineol deriva da hidroxilação do γ -terpineno ou do linalol, e está frequentemente associado à defesa química, com ação antimicrobiana, repelente e antioxidante (Peana et al., 2002; Moghaddam et al., 2013). Sua variabilidade pode indicar diferentes intensidades de resposta da planta aos estímulos endofíticos.

O *o*-cimeno é um monoterpene aromático identificado em diversas espécies vegetais, incluindo *Origanum majorana*, embora em concentrações variáveis. Em geral, o *p*-cimeno é o isômero mais prevalente nos óleos essenciais dessa espécie, podendo atingir teores expressivos, enquanto o *o*-cimeno tende a ocorrer em menores proporções. A composição do óleo essencial de *Origanum majorana* pode variar significativamente de acordo com a origem geográfica, condições ambientais, estágio fenológico e até mesmo a interação com microrganismos (Sellami et al., 2009; Guerra-Boone et al., 2015).

Quimicamente, o *o*-cimeno é um isômero estrutural do *p*-cimeno (1-metil-4-(1-metiletil) benzeno), distinguindo-se pela posição orto dos grupos metila e isopropila no anel aromático. Essa diferença estrutural pode influenciar propriedades físico-químicas e bioativas (Kamitsou et al., 2014).

Do ponto de vista biossintético, o *o*-cimeno é derivado da via do 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), também conhecida como via DOXP, uma rota metabólica plastidial que origina o geranyl pirofosfato (GPP), precursor comum dos monoterpenos (Dudareva et al., 2013). Enzimas específicas catalisam a conversão de GPP em γ -terpineno, o qual pode ser posteriormente transformado em *o*-cimeno por meio de reações de desidrogenação e rearranjo estrutural (Kamitsou et al., 2014). Essa modulação da via MEP por estímulos endógenos ou exógenos, como a presença de fungos endofíticos, pode resultar no aumento da síntese de certos monoterpenos com funções ecológicas e farmacológicas, como o *o*-cimeno.

Outros compostos voláteis apresentaram concentrações elevadas nas plantas inoculadas com isolados de *Paraconiothyrium* spp., evidenciando a capacidade desses microrganismos em modular rotas metabólicas específicas. Dentre os metabólitos analisados, o γ -terpineno destacou-se como o composto de maior teor nas plantas inoculadas com *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3699). Este monoterpene é sintetizado pela rota plastidial do 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP/DOXP), a partir do pirofosfato de geranila (GPP), sendo um importante precursor na formação de compostos fenólicos como timol e *o*-cimeno (Beekwilder et al., 2004). Sua presença está associada a atividades antimicrobianas, antioxidantes e efeitos protetores contra estresses bióticos (Moghaddam et al., 2013).

Entre os monoterpenos oxigenados, o linalol e o α -terpineol apresentaram teor expressivo nas plantas inoculadas com *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3697). O linalol, um álcool monoterpênico derivado do GPP via MEP, é reconhecido por sua ação ansiolítica, antifúngica e por atuar como precursor de linalil acetato e borneol. O α -terpineol, por sua vez, pode ser formado a partir da oxidação enzimática do linalol, e possui efeitos repelentes de insetos e propriedades antimicrobianas (Peana et al., 2002; Rehman et al., 2016). A presença elevada

desses compostos sugere que os isolados fúngicos atuaram como eliciadores da rota MEP, favorecendo a conversão de intermediários voláteis bioativos.

A elicitação do metabolismo secundário por microrganismos endofíticos tem sido amplamente reportada em plantas medicinais, particularmente na indução de compostos voláteis com propriedades funcionais. Os endófitos podem ativar biossinteticamente tanto a via MEP quanto a citosólica do mevalonato (MVA), contribuindo para o aumento de monoterpenos, sesquiterpenos e fenóis voláteis envolvidos em defesa química, sinalização e comunicação interespecífica (Dudareva et al., 2013; Strobel, 2018). A presença de fungos endofíticos dos gêneros identificados *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* foram capazes de modular a emissão de compostos voláteis em *Piper* sp, revelando a influência significativa dos endofíticos no perfil químico da planta hospedeira (Florindo, 2019). Em *Passiflora incarnata*, a associação com *Trichoderma* sp. e *Aspergillus* sp. levou a um aumento dos metabólitos antioxidantes relacionados à fração volátil (SILVA, 2017). Em *Eremanthus erythropappus*, o cultivo com endófitos promoveu a síntese de compostos com ação antimicrobiana e antiproliferativa (Pinto, 2016).

Esses achados corroboram os resultados do presente estudo, em que isolados de *Paraconiothyrium* spp. demonstram induzir alterações expressivas no perfil volátil de *Origanum majorana* L., promovendo o acúmulo de compostos como γ -terpineno, *o*-cimeno, linalol e α -terpineol, todos associados a aplicações farmacêuticas, alimentares e agrícolas.

4.7 Análise dos Componentes Principais

A análise de componentes principais (PCA), representando 79% da variabilidade total dos dados (PC1: 52,20%; PC2: 26,79%), permitiu a distinção nas variáveis matéria seca, compostos voláteis, índice de clorofila e arbutina entre as plantas inoculadas com os isolados de *Paraconiothyrium* spp. e as plantas controles.

Analisando o gráfico Score Plot (Figura 6), pode-se observar o agrupamento e discriminação de *Paraconiothyrium cyclothyrioide* (CML 3698), representado pela cor verde, localiza-se no quadrante superior esquerdo da PCA, sendo altamente correlacionado com os parâmetros PSR (peso seco de raiz), ARB (arbutina), (Z)- β -ocimeno e α -terpineol. Isso indica que esse isolado promoveu não só maior desenvolvimento radicular como também aumento de metabólitos com potencial antioxidante e farmacológico.

Tabela 3 - Composição química volátil de *Origanum majorana* cultivada com os fungos endofíticos do gênero *Paraconiothyrium*.

Nº pico	Constituinte	IR _C	IR _L	Área %					
				CML 3695	CML 3696	CML 3697	CML 3698	CML 3699	Controle
1	α -tujeno	923	924	1,22±0,06	1,19±0,04	1,25±0,07	1,10±0,04	1,17±0,04	1,16±0,03
2	α-pineno	930	932	0,76±0,04	0,73±0,02	0,78±0,06	0,69±0,02	0,76±0,02	0,74±0,01
3	canfeno	944	946	0,69±0,05	0,69±0,06	0,76±0,09	0,64±0,03	0,77±0,01	0,74±0,00
4	sabineno	969	969	0,13±0,01	0,19±0,00	0,17±0,03	0,20±0,02	0,20±0,03	0,20±0,00
5	1-octen-3-ol	975	974	1,58±0,05	1,43±0,07	1,43±0,04	1,57±0,03	1,53±0,02	1,51±0,10
6	3-octanona	984	979	0,13±0,01	0,13±0,01	0,10±0,00	0,12±0,01	0,11±0,00	0,09±0,01
7	mirreno	990	988	3,61±0,02	3,60±0,12	3,63±0,16	3,62±0,12	3,50±0,03	3,67±0,04
8	3-octanol	995	988	0,20±0,04	0,14±0,02	0,21±0,03	0,16±0,02	0,16±0,00	0,18±0,00
9	α-felandreno	1004	1002	0,16±0,01	0,16±0,01	0,22±0,01	0,16±0,01	0,21±0,00	0,22±0,01
10	α-terpineno	1014	1014	1,78±0,14	1,86±0,19	2,68±0,04	1,93±0,15	2,30±0,05	3,14±0,05
11	o-cimeno	1021	1020	22,57±2,63	17,86±2,66	13,13±1,62	14,40±0,74	13,90±0,26	7,53±1,03
12	silvestreno	1024	1025	0,50±0,01	0,54±0,01	0,52±0,03	0,54±0,00	0,57±0,05	0,57±0,01
13	(Z)-β-ocimeno	1034	1032	5,65±0,08	5,88±0,13	5,92±0,14	6,22±0,10	5,89±0,30	6,16±0,13
14	(E)-β-ocimeno	1044	1044	1,50±0,05	1,78±0,06	1,74±0,09	1,95±0,04	1,73±0,10	2,06±0,07
15	γ-terpineno	1055	1054	29,67±0,95	29,00±0,95	34,74±0,72	28,31±1,50	31,12±0,43	34,40±0,21
16	ni	1062		0,47±0,01	0,45±0,00	0,37±0,08	0,40±0,06	0,38±0,11	0,32±0,06
17	terpinoleno	1085	1086	0,16±0,01	0,17±0,00	0,18±0,00	0,18±0,01	0,19±0,01	0,19±0,01
18	linalol	1101	1095	7,40±0,01	6,46±0,44	7,08±0,00	7,45±0,13	6,88±0,68	6,74±0,20
19	allo-ocimeno	1126	1128	0,28±0,01	0,33±0,03	0,31±0,39	0,34±0,02	0,32±0,02	0,33±0,01
20	borneol	1158	1165	0,97±0,01	1,03±0,09	1,11±0,00	1,08±0,01	1,19±0,10	1,20±0,02
21	α-terpineol	1188	1186	7,77±1,58	11,64±1,25	8,46±0,12	13,25±0,99	12,34±2,38	11,75±0,51
22	éter metil timol	1232	1232	1,96±0,42	1,51±0,35	2,05±3,24	1,67±0,06	1,81±0,19	1,51±0,02
23	éter metil carvacrol	1240	1241	0,73±0,09	0,73±0,14	0,72±0,35	0,80±0,04	0,74±0,15	0,63±0,10
24	timol	1292	1299	1,01±0,20	1,75±0,60	2,16±0,01	2,41±0,40	2,05±0,51	2,50±0,04
25	(Z)-cariofileno	1408	1408	2,73±0,01	2,69±0,21	2,81±0,08	2,62±0,02	2,66±0,12	2,88±0,02
26	germacrenol D	1470	1480	4,00±0,38	4,08±0,37	4,95±0,05	4,35±0,05	4,42±0,23	5,55±0,01
27	τ-elemeno	1485	1484	1,79±0,28	1,97±0,13	2,26±0,20	2,29±0,18	2,32±0,00	3,03±0,13
Alcôois e cetona alifáticos totais				1,92	1,75	1,76	1,85	1,81	1,77
Monoterpenos hidrocarbonetos totais				68,54	63,83	65,85	60,12	62,44	60,93
Monoterpenos oxigenados totais				16,13	19,13	16,65	21,74	20,41	19,69
Monoterpenos fenólicos totais				3,65	3,99	2,83	4,88	4,60	4,64
Sesquiterpenos hidrocarbonetos totais				8,52	8,74	10,02	9,26	9,40	11,46
Não identificado				0,47	0,45	0,37	0,40	0,38	0,32
AREA TOTAL				99,24	97,89	97,48	98,24	99,08	98,80

IR_C: Índice de retenção calculado relativo à série *n*-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. IR_L: Índice de retenção relatado na literatura (ADAMS, 2017; NIST, 2025). ni: não identificado.

Tal associação sugere ativação conjunta das vias MVA e MEP induzidas pela simbiose endofítica, conforme discutido por Díaz et al. (2021). Os isolados *Paraconiothyrium cyclothyrioide* (CML 3697), *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3699) e o controle posiciona-se no lado direito do gráfico, associado a parâmetros fisiológicos como: Cl a, Cl b e Cl total (teores de clorofilas), PSC (peso seco de caule), PSF (peso seco de folhas), e NDVI, índice de vegetação. Esses parâmetros são fortemente carregados no eixo PC1 (>0,9), indicando que tais variáveis são determinantes para a separação desse grupo. Esse padrão sugere que esses isolados preservaram ou levemente estimularam a capacidade fotossintética e o acúmulo de biomassa aérea, o que pode estar relacionado à emissão de compostos voláteis como γ -terpineno, também projetado na mesma direção (Beekwilder et al., 2004; Marchese et al., 2016).

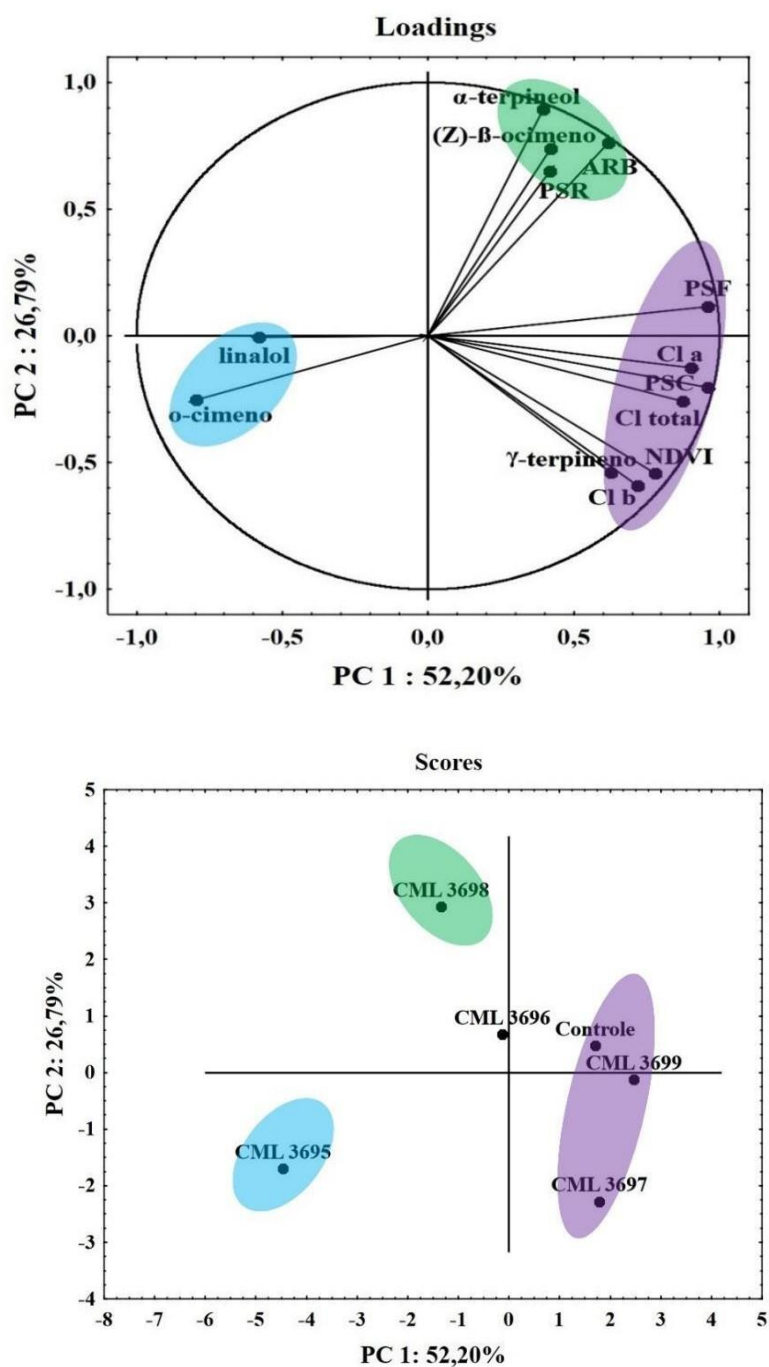
Paraconiothyrium estuarinum (CML 3695, representado pela cor azul), posicionado no quadrante inferior esquerdo, está mais correlacionado com linalol e *o*-cimeno, compostos com atividade inseticida e de defesa química. A baixa associação com variáveis fisiológicas pode indicar que este isolado modulou preferencialmente rotas metabólicas secundárias, com menor impacto sobre biomassa ou pigmentos fotossintéticos. Enquanto o *P. estuarinum* (CML 3696) posicionado próximo ao centro do gráfico, não apresentou associação expressiva com nenhuma variável, indicando um efeito neutro sobre os parâmetros avaliados.

O gráfico de loadings mostra que Clorofila a, b e total, PSC, PSF e NDVI estão positivamente correlacionadas entre si, e com os tratamentos *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3699), *Paraconiothyrium cyclothyrioide* (CML 3697) e controle reforçando que esses endofíticos mantiveram a eficiência fotossintética e o acúmulo de biomassa.

Matéria seca da raiz (PSR) e teor de arbutina (ARB) estão positivamente relacionadas ao isolado *P. cyclothyrioide* (CML 3698), sinalizando que este fungo promoveu tanto o crescimento radicular quanto o acúmulo de compostos bioativos.

Compostos voláteis como linalol e *o*-cimeno aparecem com vetores opostos aos parâmetros fisiológicos, sugerindo um possível trade-off entre crescimento vegetativo e defesa metabólica. O termo *trade-off* refere-se a uma compensação funcional, em que o investimento metabólico da planta em determinada via, como a síntese de compostos secundários de defesa, pode ocorrer à custa de outros processos, como o acúmulo de biomassa vegetativa (Pieterse et al., 2014).

Figura 6 - Análise de componentes principais (PCA1 e PCA2) dos tratamentos e dos parâmetros fisiológicos (NDVI, Cla, Cl b, CLt, PSF, PSC, PSR), teor de ARB e compostos voláteis.



Fonte: elaboração própria

No presente estudo, tal fenômeno pode ser sugerido para o *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3695) cujas plantas apresentaram maior teor de compostos voláteis bioativos (como o- cimeno e linalol), mas menor correlação com parâmetros fisiológicos de crescimento, como NDVI e massa seca. Esse redirecionamento metabólico pode refletir a

ativação de respostas de resistência ou tolerância induzidas pela presença do endofítico.

A dispersão dos tratamentos no biplot da PCA indica que os isolados *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3695) e *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3698) estão fortemente associados ao aumento das concentrações de *o*-cimeno e linalol, respectivamente. O *o*-cimeno, 22,57% em *P. estuarinum* (CML 3695) contra 7,53% no controle, mostrou-se o composto com maior poder discriminante, sendo o principal responsável pela separação do grupo *P. estuarinum* (CML 3695) no plano fatorial. Este composto é um monoterpene aromático associado à defesa vegetal e comunicação interespecies, sendo relatado como indutor de respostas de resistência sistêmica (Xu et al., 2022).

Paraconiothyrium estuarinum (CML 3699) apresentou forte correlação com a elevação de γ -terpineno (31,12%) e α -terpineol (12,34%), compostos derivados da via do pirofosfato de geranila (GPP) na rota MEP/DOXP. Ambos possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes, sugerindo uma modulação da planta hospedeira por meio da indução de mecanismos de defesa (Pieterse et al., 2014; Beekwilder et al., 2004). No caso do *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3697), observou-se maior teor de germacreno D (4,95%) e timol (2,16%), destacando o potencial dos endofíticos em induzir a produção de sesquiterpenos e fenóis, compostos com reconhecida ação antifúngica e bioestimulante. O timol, em particular, é um metabólito terminal da oxidação do γ -terpineno e sua produção pode estar associada à indução de estresse oxidativo leve promovido pela presença do endofítico (Díaz et al., 2021).

Os compostos mais fortemente correlacionados com o controle (plantas não inoculadas) foram o γ -terpineno e o τ -elemeno, porém, em níveis comparativamente inferiores aos tratamentos com isolados fúngicos, sugerindo que os microrganismos atuaram como eliciadores metabólicos capazes de modular qualitativamente e quantitativamente a emissão de voláteis.

Adicionalmente, os resultados demonstram que os monoterpene oxigenados apresentaram incremento nos tratamentos inoculados, principalmente *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML 3698) e *Paraconiothyrium estuarinum* (CML 3699), (21,74% e 20,41%, respectivamente), comparados ao controle (19,69%). Esse grupo de compostos, que inclui linalol, borneol e α -terpineol, é frequentemente associado a propriedades farmacológicas como ação calmante, antisséptica e antioxidante (De Oliveira et al., 2019).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, ROBERT P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (ed. 4.1). **Allured Publ Crop Carol Steam, IL**, 2017.
- AHEMAD, Munees; KIBRET, Mulugeta. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King saud University-science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.
- AL-FATIMI, Mohamed. Volatile constituents, antimicrobial and antioxidant activities of the aerial parts of *Origanum majorana* L. from Yemen. **J. Pharm. Res. Int**, v. 23, n. 10, 2018.
- ALY, Amal H. et al. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal diversity**, v. 41, p. 1-16, 2010.
- ARAÚJO, C. W. G. de; PEIXOTO NETO, P. A. de S.; CAMPOS, N. V. C.; PORFÍRIO, Z.; CAETANO, L. C. Atividade antimicrobiana da casca de *Pithecolobium avaremotemo*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 7-8, p. 698-700, 2002.
- ARGENTA, Gilber et al. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 158-167, 2001.
- AZEVEDO JL. Microrganismos endofíticos. In: Melo IS, Azevedo JL. **Ecologia microbiana**, Jaguariúna: Embrapa – CNPMA; 1998.
- AZEVEDO, Raphael Passaglia et al. Endophytic fungi assures tropical forage grass growth by water stress tolerances. **Current Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4060-4071, 2021.
- BALAHBIB, Abdelaali et al. Health beneficial and pharmacological properties of p- cymene. **Food and Chemical Toxicology**, v. 153, p. 112259, 2021.
- BETTIOL, Wagner. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 2009.
- BEEKWILDER, J. et al. Functional characterization of enzymes forming volatile compounds from the tomato cultivar Micro-Tom. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 1865– 1878, 2004.
- BINA, Fatemeh; RAHIMI, Roja. Sweet marjoram: a review of ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities. **Journal of evidence-based complementary & alternative medicine**, v. 22, n. 1, p. 175-185, 2017.
- BOO, Yong Chool. Arbutin as a Skin Depigmenting Agent with Antimelanogenic and Antioxidant Properties. **Antioxidants (Basel)**. 2021 Jul 15;10(7):1129.
- BOUYAHYA, Abdelhakim et al. Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacology of *Origanum majorana* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 265, p. 113318, 2021.
- CALA, Antonio et al. A study on the phytotoxic potential of the seasoning herb marjoram (*Origanum majorana* L.) leaves. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3356, 2021.

CHAPLA, Vanessa M.; BIASETTO, Carolina R.; ARAUJO, Angela R. Endophytic fungi: an unexplored and sustainable source of new and bioactive natural products. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.

COSSA, Melvis Celeste Vilanculos et al. Impact of photon flux density and light spectral quality on biomass production and arbutin compound accumulation in *Origanum majorana* L. plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 156, n. 1, p. 12, 2024a.

COSSA, Melvis Celeste Vilanculos et al. Impact of ventilation system with sucrose doses and wavelength on biomass production and arbutin content in *Origanum majorana* L. plantlets. **Scientia Horticulturae**, v. 337, p. 113498, 2024b.

CRAIN, J. et al. Evaluation of a reduced cost active NDVI sensor for crop nutrient management. **Journal of Sensors**, v. 2012, p.582, 2012.

DE SOUZA, Jéssica Maronez et al. Fitomassa de manjerona em intervalos de colheita em transplantes no verão e no inverno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 56, n. Y, p. 02444, 2021.

DUDAREVA, N. et al. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, v. 198, n. 1, p. 16–32, 2013.

ERENLER, Ramazan et al. Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 3, p. 822-836, 2016.

FAN, Xiaokuan et al. Endophytic fungal diversity on different aged bark of medicinal taxus plant species. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 13, n. 4, p. 544- 549, 2019.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA LTDA. Manual do medidor eletrônico de clorofila ClorofiLOG CFL 1030, Porto Alegre, p. 4, 2008.

FENG, Yi-Xi et al. The potential contribution of cymene isomers to insecticidal and repellent activities of the essential oil from *Alpinia zerumbet*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 157, p. 105138, 2021.

FERREIRA, Daniel Furtado. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Brazilian Journal of Biometrics**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

FLORINDO, J. B. Influência de fungos endofíticos sobre a emissão de voláteis em *Piper* spp. 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FREEMAN, K. W. *et al.* By-plant prediction of corn forage biomass and nitrogen uptake at various growth stages using remote sensing and plant height. **Agronomy Journal**, v.99, n.2, p.530–536, 2007.

GAMA, Danielly de Souza et al. Endophytic fungi from *Brachiaria grasses* in Brazil and preliminary screening of *Sclerotinia sclerotiorum* antagonists. **Scientia Agricola**, v. 77, p. e20180210, 2019.

GAO (2003). Technology transfer in taxol development. **United States General Accounting Office**. June 2003.

GITELSON, Anatoly A.; GRITZ, Yuri; MERZLYAK, Mark N. Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. **Journal of plant physiology**, v. 160, n. 3, p. 271-282, 2003.

GUERRA-BOONE, L. et al. Chemical composition of essential oils of *Origanum* species and their biological activities. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 649–656, 2015.

GRISDALE, Sara K.; TOWERS, G. H. N. Biosynthesis of arbutin from some phenylpropanoid compounds in *Pyrus communis*. **Nature**, v. 188, n. 4756, p. 1130-1131, 1960.

KAMITSOU, M. et al. Transformation of α -limonene into *p*-cymene over oxide catalysts: A green chemistry approach. **Applied Catalysis A: General**, v. 474, p. 224– 229, 2014.

LEMFACK, Marie Chantal et al. mVOC: a database of microbial volatiles. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D744-D748, 2014.

MHLONGO, Msizi I. et al. The chemistry of plant–microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 112, 2018.

MIGAS, Piotr; KRAUZE-BARANOWSKA, Mirosława. The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 35-40, 2015.

MOGHADDAM, M. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 9, p. 703–708, 2013.

MORATH, Shannon U.; HUNG, Richard; BENNETT, Joan W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal biology reviews**, v. 26, n. 2-3, p. 73-83, 2012.

MOLIN, José P. et al. Capacidade de um sensor óptico em quantificar a resposta da cana-de-açúcar a doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 1345-1349, 2010.

MORAES, Gleys Kellen Aquino et al. Atividade antagonista, alelopática e diversidade química de fungos endofíticos isolados de *Cochlospermum regium* L. **Revista Desafios**– v, v. 3, n. 1, 2023.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, 1962.

NAHAR, Lutfun et al. Arbutin: Occurrence in plants, and its potential as an anticancer agent. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8786, 2022.

NIST, N. I. O. S. A. T. **NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library/Analysis Program and Data for Microsoft Windows**. 05 ed. Shimadzu, USA, 2008.

NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library/Analysis Program and Data for Microsoft Windows. National Institute of Standards and Technology. 2025.

PARDO, Sthefani Nicole Frosi et al. Avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos. **Braz J Dev**, v. 8, n. 5, p. 33120-40, 2022.

PAUDEL, Prem Narayan et al. Chemical composition, enantiomeric distribution, antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum majorana* L. essential oil from Nepal. **Molecules**, v. 27, n. 18, p. 6136, 2022.

PEANA, A. T. et al. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 721–726, 2002.

PEIXOTO, Pedro Accioly Neto Sá; DE AZEVEDO, João Lúcio; CAETANO, Luiz Carlos. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, v. 3, n. 4, p. 69- 72, 2004.

PINTO, M. L. Indução de metabólitos bioativos por fungos endofíticos em *Eremanthus erythropappus*. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

POP, C. E. et al. Selection of a *Digitalis purpurea* Cell Line with Improved Bioconversion Capacity of Hydroquinone into Arbutin. **Life**, v. 14, n. 1, p. 84, 2024.

REHMAN, R. et al. Bioactive terpenes from medicinal plants: their structure, mechanisms and therapeutic potential. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 1–12, 2016.

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROUSE, J.W. et al. Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS. In: FREDEN, S. C., MERCANTI, E.P. BECKER, M. (eds) **Third Earth Resources Technology Satellite –1 Symposium. Volume I: Technical Presentations**, NASA SP-351, NASA, Washington, D.C., p. 309-317. 1974.

SANDHYA, Dulam et al. High-frequency in vitro propagation and assessment of genetic uniformity and micro-morphological characterization of *Origanum majorana* L.–A highly traded aromatic herb. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, p. 102024, 2021.

SARKAR, Sohini et al. Fungal endophyte: an interactive endosymbiont with the capability of modulating host physiology in myriad ways. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 701800, 2021.

SELLAMI, I. H. et al. Composition of essential oils and effect of drying methods on leaves of *Origanum majorana*. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 2–3, p. 354– 360, 2009.

SILVA, D. J. Atividade antioxidante de frações voláteis de *Passiflora incarnata* inoculadas com fungos endofíticos. 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina

SILVA, Lincon Rafael da; MELLO, Sueli Corrêa Marques de; MARTINS, Irene; VALADARES-INGLIS, Maria Cléria. Efeito de compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2019. 17 p.

SOUZA JUNIOR, Edgar Teixeira de et al. Comparison of different extraction techniques of *Zingiber officinale* essential oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, p. e20190213, 2020.

SALEHI, Mina et al. Elicitors derived from endophytic fungi *Chaetomium globosum* and *Paraconiothyrium brasiliense* enhance paclitaxel production in *Corylus avellana* cell suspension culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 136, p. 161- 171, 2019.

SINGH, Vivek Kumar; KUMAR, Awanish. Secondary metabolites from endophytic fungi: Production, methods of analysis, and diverse pharmaceutical potential. **Symbiosis**, v. 90, n. 2, p. 111-125, 2023.

SOARES, Deyze Alencar et al. A review of bioactive compounds produced by endophytic fungi associated with medicinal plants. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais**, v. 12, n. 3, p. 331-352, 2017.

SOARES, Deyze Alencar et al. AA review of bioactive compounds produced by endophytic fungi associated with medicinal plants. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais**, v. 12, n. 3, p. 331-352, 2017.

SOLIMAN, Sameh SM; RAIZADA, Manish N. Interactions between co-habiting fungi elicit synthesis of Taxol from an endophytic fungus in host Taxus plants. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 3, 2013.

SOUSA, Fulvia Soares Campos de. **Potencial biotecnológico de fungos endofíticos de *Pyrostegia venusta***. 2019. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/34614>.

STIERLE, A. A.; STROBEL, G. A.; STIERLE, D. B. Investigation of fungi associated with the pacific yew tree taxus-brevifolia. In: **Abstracts Of Papers Of The American Chemical Society**. 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036: AMER CHEMICAL SOC, 1993. p. 8-AGRO.

STIERLE, Andrea; STROBEL, Gary; STIERLE, Donald. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G. A. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. **Journal of Fungal Biology**, v. 122, n. 7, p. 521–528, 2018.

STROBEL, G. A. The use of endophytic fungi for the conversion of agricultural wastes to hydrocarbons. **Natural Product Report**, 2014, 447.

STROBEL GA, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol and Mol Bio Rev** 2003; 67:491-502.

SUEBRASRI, Thanapat et al. Auxin-producing fungal endophytes promote growth of sunchoke. **Rhizosphere**, v. 16, p. 100271, 2020.

TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, p. 898, 2017.

TAN, Ren Xiang; ZOU, Wen Xin. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural product reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TUCKER, C. J. Red and photographic infrared linear combinations for monitoring vegetation. **Remote Sensing Of Environment**, v. 8, n. 2, p. 127-150, maio 1979.

VAN DEN DOOL, H. A. N. D.; KRATZ, P. Dec. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of chromatography**, 1963.

VASUDEVA, Neeru; DAS, S.; SHARMA, S. K. *Origanum majorana* L.: revisão fitofarmacológica. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 6, n. 4, p. 261- 267, 2015.

WERNER, Stephanie; POLLE, Andrea; BRINKMANN, Nicole. Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 8651- 8665, 2016.

XU, Yuan et al. Volatiles from eucalyptus trunks and forest floor humus influence the habitat transfer, host selection, and aggregation of *Endoclita signifer* larvae. **Forests**, v. 13, n. 12, p. 2058, 2022.

ZOU, W. X. et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of natural products**, v. 63, n. 11, p. 1529-1530, 2000.