



**NATÁLIA DA COSTA MAIA**

**FUNGAL ENDOPHYTES OF *Panicum maximum*  
AND *Pennisetumpurpureum*: ISOLATION,  
IDENTIFICATION AND ANTIFUNGAL  
POTENTIAL**

**LAVRAS – MG**

**2015**

**NATÁLIA DA COSTA MAIA**

**FUNGAL ENDOPHYTES OF *Panicum maximum* AND  
*Pennisetumpurpureum*: ISOLATION, IDENTIFICATION AND  
ANTIFUNGAL POTENTIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Patrícia Gomes Cardoso

**LAVRAS – MG**

**2015**

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

Maia, Natália da Costa.

Fungal endophytes of *Panicum maximum* and *Pennisetum purpureum*:  
isolation, identification and antifungal potential /

Natália da Costa Maia. – Lavras : UFLA, 2015.

49 p.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientadora: Patrícia Gomes Cardoso.

Bibliografia.

1. Microrganismos. 2. Gramíneas. 3. Endófitos. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.

**NATÁLIA DA COSTA MAIA**

**FUNGAL ENDOPHYTES OF *Panicum maximum* AND  
*Pennisetum purpureum*: ISOLATION, IDENTIFICATION AND  
ANTIFUNGAL POTENTIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 10 de fevereiro de 2015.

Dra. Liana Jank Embrapa

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila UFLA

Dra. Patrícia Gomes Cardoso  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2015**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por sempre iluminar meu caminho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior(CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Patrícia Gomes Cardoso, pela orientação, paciência e amizade.

Aos meus pais, José Gonzaga Maia e Maria Aparecida da Costa Maia, pelo amor e dedicação incondicional.

Aos meus irmãos, pela amizade eterna.

Aos meus familiares, pelo carinho.

A todos os meus amigos, pelo carinho e apoio.

Aos colegas do laboratório BIOGEN, em especial à Patrícia Nirlane da Costa Souza, pelas experiências compartilhadas, amizade e incentivo recebido.

## RESUMO

Microrganismos endofíticos habitam o interior das plantas, tanto na parte aérea, como em caules e folhas, quanto em raízes, sem ocasionar prejuízo aos seus hospedeiros. Devido à importância que as gramíneas desempenham na agricultura, seus endófitos são os mais estudados até o momento. Espécies de *Panicum maximum* e *Pennisetum purpureum* são forrageiras indicadas para a produção de bovinos e ocupam uma grande área no país. Plantas de diferentes cultivares dessas duas espécies foram coletadas e os colmos usados para o isolamento dos fungos endofíticos. Estes colmos foram processados e submetidos à desinfestação e semeados em placa de Petri contendo meio BDA /cefotaxima. Foram isolados 126 fungos endofíticos, sendo 118 de *P. maximum* e 8 de *P. purpureum*. Características morfológicas e sequências ITS e 18S (NS) foram utilizadas para identificar os fungos endofíticos isolados. A maioria pertence ao filo Ascomycota e o gênero *Sarocladium* foi o mais encontrado nestas plantas. Os fungos foram avaliados quanto ao potencial de inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos *Bipolaris maydis*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum*, *Sclerotinia minor*, *Fusarium verticillioides*, *Drechslera maydis*, *Pyricularia oryzae* e *Colletotrichum graminicola*. Trinta e um mostraram ação antagonista ao crescimento de *Bipolaris maydis*, *Penicillium expansum* e *Sclerotinia minor*. Fungos endofíticos dos gêneros *Cercospora* e *Sarocladium* inibiram o crescimento do fungo fitopatogênico *S. minor* em 64% e 80%, respectivamente. A identificação e a avaliação do potencial de inibição de fungos endofíticos de gramíneas forrageiras podem contribuir para o desenvolvimento de pesquisas visando à utilização destes microrganismos no controle biológico ou como produtores de compostos bioativos.

Palavras-chave:

Microrganismos. Gramíneas. Endófitos. Fitopatógenos. Antagonismo.

## ABSTRACT

Endophytic microorganisms inhabit the interior of plants, both in shoots and in roots, without causing damage to their hosts. Due to the importance that grasses play in agriculture, their endophytes are the most studied to date. *Panicum maximum* and *Pennisetum purpureum* species are forages indicated for cattle and occupy a large area in the country. Samples of different cultivars of these species were collected and stems used for the isolation of endophytic fungi. These stems were cut into discs, submitted to surface disinfection and seeded in Petri dishes containing PDA/cefotaxime. One hundred and twenty-six endophytic fungi were isolated, 118 from *P. maximum* and 8 from *P. purpureum*. Morphological characteristics and ITS and 18S (NS) sequences were used to identify the isolated endophytic fungi. Most fungi belong to the phylum Ascomycota and the *Sarocladium* genus was dominant in this study. The fungi were evaluated for potential to inhibit the growth of pathogenic fungi *Bipolaris maydis*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum*, *Sclerotinia minor*, *Fusarium verticillioides*, *Drechslera maydis*, *Pyricularia oryzae* and *Colletotrichum graminicola*. 31 endophytic fungi inhibited the growth of pathogenic fungi *Bipolaris maydis*, *Penicillium expansum* and *Sclerotinia minor*. Endophytic fungi of the genus *Cercospora* and *Sarocladium* inhibited the growth of plant pathogenic fungus *S. minor* in 64 and 80% respectively. The identification and evaluation of the potential inhibition of endophytic fungi of forage grasses may contribute to the development of research to the use of these microorganisms in biological control or as producers of bioactive compounds.

Keywords: microorganisms, grasses, endophytic, plant pathogens, antagonism

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

Figure 1	Number of isolates of fungal endophytic from <i>Panicum maximum</i> ..	35
Figure 2	Morphology of some fungal isolates from <i>P. maximum</i> . A- <i>Cladosporium cladosporioides</i> ; B- <i>Sarocladium strictum</i> ; C- <i>Acremonium implicatum</i> ; D- <i>Sarocladium sp.</i> ; E- <i>Paraconiothyrium sp.</i> ; F- <i>Phoma sp.</i> ; G- <i>Talaromyces sp.</i> ; H- <i>Sarocladium sp.</i> ; I- <i>Fusarium sp.</i> ; J- <i>Ramichloridium sp.</i> ; L- <i>Cercospora sp.</i> ; M- <i>Mymecridium schulzeri</i> .....	37
Figure 3	Number of isolates of fungal endophytic from <i>Pennisetum purpureum</i> .....	38
Figure 4	Different isolates from <i>P. purpureum</i> . A- <i>Cladosporium sp.</i> ; B- <i>Sporisorium sp.</i> ; C- <i>Paraconiothyrium sp.</i> ; D- <i>Acremonium sp.</i> ; E and F - <i>Sarocladium sp.</i> .....	39
Figure 5	Inhibition of <i>S. minor</i> by endophytic fungi of the genus <i>Sarocladium</i> . A – <i>S. minor</i> (control), B, C, D, E and F – Different isolates of the genus <i>Sarocladium</i> inhibiting <i>S. minor</i> .....	40



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Table 1	Origin of samples of cultivars of <i>Panicum maximum</i> and <i>Pennisetum purpureum</i> .....	30
Table 2	Antagonism test of the <i>Panicummaximum</i> and <i>Pennisetum purpureum</i> endophytics against some phytopathogens .....	43

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>Introdução Geral</b>	10
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>		10
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>		11
<b>2.1</b>	<b>A espécie <i>Panicum maximum</i></b>		11
<b>2.2</b>	<b>A espécie <i>Pennisetum purpureum</i></b>		12
<b>2.3</b>	<b>Fungos endofíticos</b>		14
<b>2.4</b>	<b>Fungos endofíticos em gramíneas</b>		16
<b>2.5</b>	<b>Fungos fitopatogênicos</b>		18
	<b>REFERÊNCIAS</b>		21
	<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>Fungal Endophytes of <i>Panicum maximum</i> and <i>Pennisetum purpureum</i>: Isolation, Identification and Antifungal Potential</b>	26
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b>		27
<b>2</b>	<b>MATERIALS AND METHODS</b>		29
<b>2.1</b>	<b>Plant material</b>		29
<b>2.2</b>	<b>Endophytic fungi isolation</b>		30
<b>2.3</b>	<b>Morphological characterization and molecular identification of endophytic fungi</b>		31
<b>2.4</b>	<b>Antagonism against plant pathogenic fungi</b>		32
<b>3</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSION</b>		34
<b>4</b>	<b>CONCLUSION</b>		45
	<b>REFERENCES</b>		46

## CAPÍTULO 1

### Introdução Geral

#### 1INTRODUÇÃO

Microorganismos endofíticos habitam o interior das plantas, tanto na parte aérea como em caules, folhas e raízes, sem causar prejuízo aos seus hospedeiros. As consequências dessa interação são inúmeras, podendo facilitar a absorção de minerais, otimizar o uso da água, promover crescimento radicular, como também da parte aérea, aumentar o peso da matéria seca e a velocidade de germinação das sementes. Em quase sua totalidade, as espécies vegetais já investigadas têm microbiota endofítica.

As áreas de pastagens no Brasil ocupam cerca de 180 milhões de hectares, sendo responsáveis pela alimentação dos rebanhos leiteiros e de corte que abastecem o mercado nacional e o internacional. Cultivares das gramíneas *Panicum maximum* e *Pennisetum purpureum* ocupam grande área no país e são indicadas para a produção de bovinos. As gramíneas infectadas por endófitos têm características de interesse agropecuário, tais como o maior número de colmos e o acúmulo de matéria seca, a maior tolerância às condições extremas do ambiente e a resistência a fungos fitopatogênicos, a nematoides e a insetos. Além disso, esses microorganismos endofíticos podem produzir compostos químicos de interesse biotecnológico, como o taxol e a fitoalexina, que são muito utilizados nas indústrias farmacêutica e química. Existe um grande número de microorganismos ainda não identificados, com propriedades pouco conhecidas, mas com grande potencial de aplicação. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de isolar e identificar fungos endofíticos de diferentes cultivares de *P. maximum* e *P. purpureum* e avaliar o potencial de inibição destes fungos contra alguns fungos patogênicos de gramíneas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A espécie *Panicum maximum*

O gênero *Panicum* pertence à família *Poaceae*, tribo *Paniceae*. Esta tribo tem aproximadamente 81 gêneros e mais de 1.460 espécies, sendo *P. maximum* uma das plantas mais difundidas no Brasil. Sua origem está na África tropical, podendo ser encontrada em altitudes que variam desde o nível do mar a até 1.800 m (PAULA, 2008). Distribuiu-se dentro de uma faixa ampla do globo terrestre, que vai desde 40° S até 50° N de latitude (SORIA, 2002).

O *P. maximum* foi introduzido no Brasil no século XVIII, durante o comércio de escravos para as colônias americanas, quando eram utilizados como cama nos navios negreiros (PARSONS, 1972). A teoria mais aceita é a de que espécies de *P. maximum* se estabeleceram onde os navios foram descarregados, sendo os pássaros, as pessoas e o vento os responsáveis pela sua disseminação. Estima-se que a espécie ocupou uma área superior a seis milhões de hectares no Brasil, sendo o capim-colonião a cultivar mais comum (FERREIRA, 2005). Três espécies fazem parte do complexo agâmico de *P. maximum*: o próprio *P. maximum*, *P. infestum* e *P. trichocladum*. Essas espécies podem inter cruzar naturalmente, o que é possível por exibirem o mesmo número cromossômico e o mesmo nível de ploidia (JANK et al., 2008).

Em relação à qualidade, *P. maximum* é classificado como de alta qualidade, juntamente com as espécies de *Cynodon* e *Pennisetum*. Essa qualificação leva em consideração o conteúdo de proteína bruta, o consumo voluntário e a produção animal (PAULINO, 2004). A espécie ocupa uma faixa de, aproximadamente, 20% de toda a área de pastagens cultivadas no Brasil e supre 30% do mercado de sementes forrageiras. Devido ao seu potencial produtivo e à qualidade, é uma das forrageiras mais indicadas para a produção

de bovinos. Sua área de cultivo tem sido ampliada com o uso de cultivares melhoradas, como ‘Tanzânia’, ‘Mombaça’, ‘Massai’ e ‘Milênio’ (MARTUSCELLO et al., 2007).

O modo reprodutivo de *P. maximum*, como na maioria das gramíneas forrageiras tropicais, é a apomixia (JANK, 1995), que é um modo reprodutivo vegetativo por sementes, uma vez que o embrião não é derivado de uma fecundação. Entretanto, nesta espécie, a apomixia é facultativa, levando a novos procedimentos de reprodução (SAVIDAN, 1981). Portanto, novas cultivares forrageiras de *P. maximum* podem ser desenvolvidas pela seleção dos melhores genótipos apomíticos a partir do germoplasma ou pela geração de nova variabilidade por cruzamentos, fazendo-se, em seguida, a seleção para as características de interesse (JANK et al., 2008).

## **2.2 A espécie *Pennisetumpurpureum***

O capim-elefante *Pennisetumpurpureum* Schumacher pertence à família *Poaceae*, tribo *Paniceae* (LOPES, 2004). É uma gramínea oriunda da África Tropical e foi descoberta pelo coronel Napier Springer, em 1905. Foi introduzido, pela primeira vez, no continente americano, em 1913, pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América. Disseminou-se rapidamente pelo continente, sendo introduzido no Brasil por volta de 1920, nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, por meio de estacas originárias de Cuba e Estados Unidos (MONTEIRO, 2011). Essa rápida difusão foi atribuída às características deste capim, como elevada produção de matéria seca, rusticidade, adaptabilidade e bom valor nutritivo, dentre outras (GONÇALVES, 2004).

O capim-elefante é uma gramínea perene, com via fotossintética C4, hábito de crescimento cespitoso, folhas largas, colmos eretos, porte elevado e

abundância de perfilhos aéreos e basais, podendo chegar a 3 m de altura e formar touceiras (DESCHAMPS, 1999; GAMA, 2011; SHIMOYA et al., 2002). Apresenta inflorescência em panícula em forma de espiga com, aproximadamente, 15 cm de comprimento, podendo ser amarelada ou púrpura (LOPES, 2004).

A propagação do capim-elefante é basicamente vegetativa, realizada por estacas (pedaços de colmos) (ARAÚJO; DEMINICS; CAMPOS, 2008). Entretanto, estudos sobre a viabilidade das sementes apontaram elevado potencial da propagação de capim-elefante por meio de sementes, obtendo-se até 90% de germinação, mantendo-se viáveis por até dois anos, quando armazenadas em condições ambientais. Já existe no mercado brasileiro uma cultivar de capim-elefante hexaploide propagada por sementes, a cv. Paraíso (SOUZA SOBRINHO et al., 2008).

O capim-elefante pode ser classificado em cinco grupos, de acordo com suas características, como época de florescimento, diâmetro do colmo, pilosidade da planta, largura da folha, formato da touceira, número e tipo de perfilhos. Esses grupos são o anão, com a cultivar Mott como exemplo; o cameroon, tendo como exemplares as cultivares Cameroon e Guaçu; o mercker; o napier, com as cultivares Napier e Taiwan A-146 e, ainda, um grupo de híbridos resultantes do cruzamento entre espécies de *Pennisetum* (LOPES, 2004).

No Brasil, as gramíneas apresentam grande importância, pois compõem a alimentação dos animais dos rebanhos leiteiros e de corte. A espécie *P.purpureum* se destaca nessa função, pois tem alto potencial de produção de matéria seca, alto valor nutritivo e vem sendo apontada como a solução para a melhoria da dieta animal e o subsequente aumento de produtividade (LIMA et al., 2010). Essa gramínea é encontrada em todo o Brasil, resistindo às condições desfavoráveis como seca e frio, mas é tradicionalmente cultivada nas regiões

mais quentes, como o sudeste e o centro-oeste (DALL'AGNOL et al., 2004; QUEIROZ FILHO; SILVA; NASCIMENTO, 2000).

O grande potencial dessa gramínea tem estimulado não só o cultivo dessa espécie, como também o seu melhoramento genético. Uma cultivar proveniente do processo de melhoramento genético é a 'Paraíso', que é um híbrido resultante do cruzamento entre capim-elefante e milho (*Penissetum glaucum*). O resultado é uma planta com características intermediárias entre as duas espécies, combinando a qualidade da forragem, a resistência às doenças e a tolerância à seca do milho com rusticidade, agressividade, perenidade, elevada produção e melhor aceitação pelos bovinos. Dentre as características desejadas no processo de melhoramento estão cultivares que se propaguem via semente, resistência à cigarrinha-das-pastagens, maior velocidade de crescimento, melhor qualidade nutricional, tolerância a solos de baixa fertilidade e uma igual distribuição da produção de matéria seca durante o ano (SOUZA SOBRINHO et al., 2005).

### **2.3 Fungos endofíticos**

Os microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas, sem causar prejuízo aos seus hospedeiros. A relação endófito e hospedeiro é considerada não patogênica e, como os microrganismos estão associados a tecidos vivos, não são considerados saprófitas (VERZIGNASSI; HOMECHIN; VIDA, 1996).

No final do século XIX, surgiram os primeiros relatos sobre endofíticos e, em 1866, Bary apresentou a diferença entre eles e os microrganismos patogênicos. Entretanto, essa distinção é apenas didática, pois há uma linha tênue que os separa, sendo muito complicado distinguir cada categoria (POLLI et al., 2012). Muitos endofíticos transmitidos horizontalmente podem iniciar seu

crescimento na superfície das folhas antes da penetração. Do mesmo modo, endófitos podem se tornar epífitos, quando o tecido interno torna-se exposto. Mudanças ambientais podem desencadear patogenicidade a um microrganismo endofítico que anteriormente não causava sintomas (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011). Ou seja, há um gradiente e não distinções abruptas dentro dessas categorias (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

A penetração dos endofíticos na planta hospedeira pode ocorrer por meio de aberturas naturais, como estômatos, ferimentos e regiões de emissão de raízes secundárias, ou por sementes (POLLI et al., 2012). Eles estão presentes em diversas partes do vegetal, como inflorescência, brotos e folhas, sendo encontrado em plantas inferiores, como líquens, em monocotiledôneas e, predominantemente, em dicotiledôneas (VERZIGNASSI; HOMECHIN; VIDA, 1996). Quando atingem o interior da planta, esses microrganismos se disseminam de maneira sistêmica para várias partes dela, habitando ativamente o apoplasto, vasos condutores e, até mesmo, colonizando o espaço intracelular (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Na maioria das vezes, ocorre a produção ou a indução de metabólitos primários e secundários pelos microrganismos que podem atribuir vantagens à planta, como redução da herbivoria e ataque de insetos, tolerância a estresses abióticos e controle de outros microrganismos patogênicos (POLLI et al., 2012).

Um dos metabólitos já isolados de fungos endofíticos é o taxol, que é amplamente utilizado em tratamentos contra o câncer e de alto valor no mercado. Ele é produzido pelo fungo *Taxomyces andreanae*, encontrado no interior da planta *Taxus brevifolia*. Outro fungo endofítico, o *Pestalotiopsis microspora*, isolado da *T. wallachiana*, também produz o taxol. A descoberta de fungos endofíticos produtores deste composto permitiu uma produção mais eficiente com menor custo desse fármaco (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).



A planta *Artemisiaannua* é muito conhecida pela produção de metabólitos que combatem a malária (LIU et al., 2001). Foram isolados 39 fungos endofíticos desta planta que, *in vitro*, apresentaram atividade antifúngica contra os fitopatógenos. São eles: *Gaeumannomycesgraminis* var. *tritici*, *Rhizoctoniacerealis*, *Helminthosporiumsativum*, *Fusariumgraminearum*, *Gerlachianivalis* e *Phytophthora capsici*.

Os fungos endofíticos *Alternaria* sp. e *Eurotium rubrum* foram isolados de plantas de manguezais marinhos *Aegiceras corniculatum* e *Hibiscus tiliaceus*, respectivamente, e estão sendo estudados quanto à produção de pigmentos brilhantes, revelando uma nova fonte de moléculas de interesse industrial (DUFOSSE et al., 2014).

#### **2.4 Fungos endofíticos em gramíneas**

O estudo de endofíticos em gramíneas é de grande importância, uma vez que eles podem conferir a elas características de interesse agropecuário, tais como maior número de colmos e acúmulo de matéria seca, e maior tolerância às condições extremas do ambiente (KLECZEWSKI et al., 2012) e ao ataque de insetos (CLAY, 1990). A resistência a insetos, proveniente da associação gramínea-fungo, é atribuída à presença de alcaloides que protegem a pastagem do ataque de coleópteros (POLLI et al., 2012).

O fungo *Epicoccum nigrum*, isolado de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), produziu compostos que inibiram, *in vitro*, fitopatógenos desta cultura, tais como *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum falcatum*, *Ceratocystis paradoxa* e *Xanthomonas albilineans* (FÁVARO; SEBASTIANES; ARAÚJO, 2012). Este fungo desempenha uma relação endofítica facultativa com seu hospedeiro, com

preferência pelo filoplano, o que torna essa relação promissora para futuros estudos de biocontrole.

Foram isolados fungos endofíticos tanto da parte aérea quanto da raiz, em três estágios de desenvolvimento da forrageira “switchgrass” (*Panicumvirgatum* L.). Essa gramínea é nativa do norte dos EUA e apresenta grande potencial bioenergético (GHIMIRE et al., 2011). Foram obtidos 555 isolados, dos quais 143 foram de parte aérea e 412, de tecidos da raiz. Em relação aos fungos isolados da parte aérea, o número aumentou quando a coleta foi realizada do mês de abril (período vegetativo) a julho (reprodutivo). Porém, este número diminuiu no mês de outubro (senescência). Já em relação aos fungos isolados de raiz, não houve alteração no número, neste mesmo mês. Acredita-se que essa diferença esteja relacionada à quantidade de nutrientes nas folhas, que é menor no período de senescência, e à queda de temperatura no final do ciclo, o que pode ter impacto negativo no crescimento e na manutenção dos endófitos nos tecidos foliares.

Em outro estudo utilizando “switchgrass” foram isolados fungos endofíticos e reinoculados para avaliar os efeitos na produção de biomassa (KLECZEWSKI et al., 2012). Os resultados revelaram que os isolados *Phaeosphaeriapontiformis*, *Epicoccumnigrume* *Colletotrichum* sp. aumentaram o total de biomassa da planta em 22%-33%.

Existem poucos trabalhos com endofíticos isolados da gramínea *P. purpureum*. Os fungos *Nigrospora* sp. e *Mucor* sp. foram isolados de colmo e folhas de *Pennisetum* sp., na Índia, para fins de análise enzimática. O isolado *Nigrospora* sp. apresentou boa atividade para as enzimas amilase, celulase, protease e lacase (PATEL et al., 2013).

As espécies de *Colletotrichumfructicola*, *C. tropicale* e *C. siamense* foram relatadas, pela primeira vez, associadas a *P.purpureum*, na Tailândia.

Além disso, uma nova espécie, *C. endophytica*, foi descoberta associada a essa gramínea (MANAMGODA et al., 2013).

## 2.5 Fungos fitopatogênicos

Alguns fungos endofíticos podem produzir substâncias ou induzir as plantas à resistência ao ataque de vários fungos fitopatogênicos. As gramíneas e as leguminosas forrageiras, quando infectadas por microrganismos patogênicos, podem sofrer alterações bioquímicas, modificando a palatabilidade, interferindo na alimentação animal e promovendo danos na produção e na qualidade das mesmas (MARTINEZ-FRANZENER, 2006). As principais doenças encontradas em gramíneas forrageiras são as manchas foliares (MARTINEZ; FRANZENER; STANGARLIN, 2010).

Com base na morfologia dos conídios, o gênero *Helminthosporium*, patógeno de cereais, foi dividido nos gêneros *Bipolaris*, *Drechslera* e *Exserohilum* (MALLMANN, 2005). O fungo *Bipolarismaydis* é comumente relatado em espécies vegetais. No milho, este fungo pode causar a helmintosporiose, que gera grandes prejuízos para a cultura (MARTINEZ; FRANZENER; STANGARLIN, 2010). O fungo *Drechsleramaydis* infecta sementes de milho, podendo ocasionar podridões das mesmas, podridões radiculares e morte de plântulas, o que conduz à formação de lavouras com baixa população de plantas (PADILHA et al., 2006).

O fungo *Colletotrichumgraminicola* é o agente etiológico da antracnose, a principal doença da cultura do sorgo (*Sorghum bicolor*) no Brasil (COSTA et al., 2003). Seu controle é considerado muito importante para a produção de sementes, pois pode ocasionar perdas superiores a 80% na produtividade, causar esterilidade parcial de panículas e afetar a qualidade da semente e forragem produzida (SILVA, 2012).

Outro gênero de grande importância na agricultura é o *Fusarium*, que causa doenças conhecidas por podridão de raízes, murcha ou fusariose, em várias culturas, como trigo, milho, soja e feijão. A espécie *Fusariumverticillioides* é o patógeno mais comum no milho e é responsável pela podridão na espiga. Além disso, pode produzir micotoxinas (GASPERINI, 2011).

Outro fungo responsável por podridão dos tecidos vegetais e murchamento das folhas é o *Sclerotinia minor*, que está amplamente distribuído pelo mundo e com mais de 400 plantas hospedeiras. Devido à sua capacidade de formar estruturas de resistência, os escleródios, seu controle tem sido dificultado (ROMERO et al., 2009).

O fungo *Pyricularia oryzae* causa a brusone-do-arroz, uma das doenças mais destrutivas e que está presente em todas as regiões produtoras (FILIPPI; SILVA; PRABHU, 2007). Os danos nas folhas geram prejuízos indiretos, afetando a fotossíntese e a respiração; já nas panículas, seu efeito é direto, atuando em diferentes componentes de produção (PRABHU et al., 2003).

Fungos de armazenamento são responsáveis por grandes perdas em diversas culturas, sendo representados, em sua maioria, por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Entre essas espécies estão o *Aspergillus ochraceus*, que pode acelerar o processo de deterioração de grãos, causando emboloramento visível, odor desagradável, descoloração, perda de matéria seca, mudanças químicas e nutricionais e perda de qualidade, além da produção de micotoxinas, como a ocratoxina (DIAS, 2012). A espécie de *Penicillium expansum*, causadora do mofo-azul, gera perdas durante o armazenamento de maçãs. Ele está presente em várias regiões produtoras e é o responsável por podridões dos frutos e pela produção da patulina, uma micotoxina teratogênica e cancerígena (BLUM et al., 2007; COELHO et al., 2011).



## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICS, B. B.; CAMPOS, P. R. S. S. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 57, n. 1, p. 61-76, mar. 2008.
- BLUM, L.E.B.et al. Fosfitos aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs 'Fuji' e 'Gala'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.29, n.2, p. 265-268, 2007.
- CLAY, K. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 21, p. 275-297, 1990.
- COELHO, A.R.et al. Avaliação do potencial antagonístico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n.1, p.1879-1892, 2011.
- COSTA, R.V.et al. A Antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 345-354, ago. 2003.
- DALL'AGNOL, M.et al. Produção de forragem de capim-elefante sob clima frio: curva de crescimento e valor nutritivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.33, n.5, p.1110-1117, set./out. 2004.
- DESCHAMPS, F.C. Implicações do período de crescimento na composição química e digestão dos tecidos de cultivares de capim elefante. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.28, n. 6, p.1178-1189, nov./dez. 1999.
- DIAS, I. **Crescimento micelial e produção de toxinas por fungos de armazenamento associados a grãos de milho sob diferentes níveis de restrição hídrica**. 2012. 58f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- DUFOSSÉ, L.et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.26, p. 56-61, Apr. 2014.

FAVARO, L.C.L.; SEBASTIANES, F.L.S.; ARAÚJO, W.L. Epicoccumnigrum P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. **PloSOne**, San Francisco, v.7, n.6, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0036826>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

FERREIRA, M. V. B. **Efeitos de doses de potássio em caracteres agrônômicos, morfológicos e estruturais de *Panicummaximum* cv. Tanzânia -1 sob pastejo**. 2005. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2005.

FILIPPI, M. C. C.; SILVA, G. B.; PRABHU, A. S. Indução de resistência à brusone em folhas de arroz por isolado avirulento de Magnaportheoryzae. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 5, p. 387-392, set./out. 2007.

GAMA, D.S. **Estrutura do pasto e valor nutritivo de clones de capim-elefante anão (*Pennisetumpurpureum*Schum.) sob lotação rotacionada**. 2011. 48 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Centro de Ensino Superior de Juiz De Fora, Juiz de Fora, 2011.

GASPERINI, A. **Biocontrole de *Fusariumverticillioides* em milho**. 2011. 53 p. Monografia (Graduação em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

GHIMIRE, S.R. et al. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicumvirgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. **FungalDiversity**, Hong Kong, v.47, n. 1, p.19-27, Mar. 2011.

GONÇALVES, J.S. **Valor nutritivo e características fermentativas de silagens de capim elefante (*PennisetumPurpureum*Schum.) cv. roxo contendo níveis crescentes do subproduto da semente do urucum (*Bixaorellana*L.)**. 2004. 61 p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

JANK, L. Melhoramento e seleção de variedades de *Panicummaximum*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 12., 1995, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1995. p.21-58.

JANK, L. et al. Melhoramento Genético de *Panicum maximum* Jacq. In: RESENDE, R.M.S.; VALLE, C.B. do; JANK, L. (Ed.). **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2008. p. 55-87.

KLECZEWSKI, N.M. et al. A survey of endophytic fungi of switchgrass (*Panicum virgatum*) in the Midwest, and their putative roles in plant growth. **Fungal Ecology**, New York, v.5, n. 5, p.521-529, Oct. 2012.

LIMA, E.S. et al. Características agronômicas e nutritivas das principais cultivares de capim-elefante do Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 324-334, 2010.

LIU, C.H. et al. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 88, n. 3, p. 277-282, 2001.

LOPES, B.A. O capim-elefante. In: SEMINÁRIO APRESENTADO À DISCIPLINA ZOO 645: MÉTODOS NUTRICIONAIS E ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, 2004, Viçosa, MG. **Anais... Viçosa, MG: UFV, 2004.1 CD-ROM.**

MALLMANN, G. **Formação e expansão de lesões de *Bipolaris sorokiniana* em trigo**. 2005. 83f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2005.

MANAMGODA, D.S. et al. Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 61, n. 1, p.107-115, July 2013.

MARTINEZ, A. S.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. Dano causado por *Bipolaris maydis* em *Panicum maximum* cv. Tanzânia. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n. 4, p. 863-870, 2010.

MARTINEZ-FRANZENER, A.S. **Avaliação do dano provocado por *Bipolaris maydis* em *Panicum maximum* cv. Tanzânia-1**. 2006. 44f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2006.

MARTUSCELLO, J. A. et al. Repetibilidade de caracteres agronômicos em *Panicum maximum* Jacq. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.36, n.6, p.1975-1981, 2007.



MONTEIRO, H.C.F. **Estratégias de manejo do capim-elefante cv. Napier sob pastejo rotativo**. 2011. 133 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

PADILHA, L. et al. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes híbridas de milho doce armazenadas. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 2.; SIMPÓSIO SOBRE COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA, 1., 2006, Belo Horizonte. **Anais...** SeteLagoas: ABMS, 2006. 1 CD-ROM.

PARSONS, J. J. Spread of African pasture grasses of the american tropics. **Journal of Range Management**, Tucson, v. 25, n. 1, p. 12-17, Jan. 1992.

PATEL, C. et al. Studies on biodiversity of fungal endophytes of indigenous monocotaceous and dicotaceous plants and evaluation of their enzymatic potentialities. **International Journal of Scientific and Research Publications**, New Delhi, v. 3, n. 7, p. 1-5, July 2013.

PAULA, C. C. L. de. **Manejo de pastagens de Panicum maximum**. Porto Alegre: UFRGS, 2008. 35 p.

PAULINO, V. T. Potencialidades de pastagens tropicais para produção animal. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO ANIMAL A PASTO NO NORTE PIONEIRO, 1., 2004, Santo Antônio da Platina. **Anais...** Santo Antônio da Platina: UENP, 2004. Disponível em: <<http://www.ufrj.br/posgrad/cpz/forragem/12.pdf>>. Acesso em: 7 jun. 2012.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano 5, n.29, p.62-76, nov./dez. 2002.

POLLI, A. et al. Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 7, n. 2, p. 82-89, 2012.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: Endophytes and microbiomes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 291-315, 2011.

- PRABHU, A.S. et al. Estimativa de danos causados pela brusonena produtividade de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1045-1051, set. 2003.
- QUEIROZ FILHO, J.L.; SILVA, D.S.; NASCIMENTO, I.S. Produção de matéria seca e qualidade do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) cultivar roxo em diferentes idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.29, n. 1, p.69-74, jan. 2000.
- ROMERO, A. L. et al. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.11, n. 3, p.15-18, 2009.
- SAVIDAN, Y. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq). In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 14., 1981, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Westview, 1981. p. 182-184.
- SHIMOYA, A. et al. Repetibilidade de características forrageiras do capim-elefante. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.2, p. 227-234, 2002.
- SILVA, D.D. **Recomendação de cultivares de sorgo forrageiro para resistência à antracnose foliar**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2012. 6 p. (Circular Técnica, 176).
- SORIA, L. G. T. **Produtividade do capim-Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. Cv. Tanzânia) em função da lâmina de irrigação e de adubação nitrogenada**. 2002. 170 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.
- SOUZA SOBRINHO, F. et al. Avaliação agronômica de híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milheto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n. 9, p.873-880, set. 2005.
- SOUZA SOBRINHO, F. et al. Avaliação do potencial de propagação por sementes de capim-elefante hexaplóide. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, p.974-977, maio/jun. 2008.
- VERZIGNASSI, J. R.; HOMECHIN, M.; VIDA, J. B. Microrganismos endofíticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 93-98, 1996.

## CAPÍTULO 2

### **Fungal Endophytes of *Panicum maximum* and *Pennisetum purpureum*: Isolation, Identification and Antifungal Potential**

#### **ABSTRACT**

Endophytic microorganisms inhabit the interior of plants, both in shoots and roots, without causing damage to their hosts. Due to the importance that grasses play in the agriculture, their endophytes are the most studied to date. *Panicum maximum* and *Pennisetum purpureum* species are forages indicated for cattle and occupy a large area in the country. Samples of different cultivars from these species were collected and the stems used for endophytic fungi isolation. These stems were cut into discs, submitted to surface disinfection and seeded in Petri dishes containing PDA/cefotaxime. One hundred and twenty-six endophytic fungi were isolated, 118 from *P. maximum* and 8 from *P. purpureum*. Morphological characteristics and ITS and 18S (NS) sequences were used to identify the isolated endophytic fungi. Most fungi belong to the phylum Ascomycota and the *Sarocladium* genus was dominant in this study. The isolates were submitted to antagonism tests against pathogenic fungi and 31 endophytic fungi inhibited the growth of pathogenic fungi *Bipolaris maydis*, *Penicillium expansum* and *Sclerotinia minor*. These results suggest that the isolates identification enhanced the understanding of endophytes in grasses and are new sources of antifungal metabolites that can be used for biotechnological purposes.

Keywords: Microorganisms. Grasses. Endophytic. Plant pathogens. Antagonism.

## 1 INTRODUCTION

In Brazil, the grasses have great importance because they comprise animal feed for dairy and beef cattle (LIMA et al., 2010). *Panicum maximum* and *Pennisetumpurpureum* belong to the *Poaceae* family and have Tropical Africa as their center of origin (BRAZ et al., 2006; DINARDO et al., 2003; NDEMAH et al., 2000), being two of the main forage grasses of Tropical America, with great importance in the pastures formation , since they have high nutritional value and high dry matter production potential (DIAS; ALVES, 2008; LÉDO et al., 2008; LIMA et al., 2010; QUEIROZ et al., 2014).

Plants are constantly involved in interactions with a wide range of microorganism populations. In these associations the microorganisms can be classified as rhizospheric, epiphytic and endophytic (GUPTA et al., 2014). Endophytic fungi inhabit plant organs at some stage in their life cycle, and colonize the internal tissues of plants without causing apparent damage to their host (PETRINI, 1991).The endophytic constitute a valuable source of bioactive secondary metabolites (NAIK et al., 2009) which can protect their host against pathogen, insect or animal attacks, or even have direct or indirect effects on plant growth.

There have been very few studies on the warm season grasses and their associated endophytes (GHIMIRE et al., 2011). *Epicoccumnigrum*, endophytic fungi when associated with sugarcane promoted an increase in the plant root biomass and produced compounds which inhibited *Fusariumverticillioides* growth, a pathogen to this culture (FÁVARO; SEBASTIANES; ARAÚJO, 2012). The association of endophytic fungus *Balansiahenningsiana* with *Panicumagrostoides* provided greater vigor, due to higher production of tillers and consequently increased persistence of the plant in the field (CLAY; CHEPLICK; MARKS, 1989). Endophytic fungi, such as

*Phaeosphaeria pontiformis*, *Epicoccum nigrum* and *Colletotrichum* sp. were isolated of *Panicum virgatum* (Switchgrass) and they increased total plant biomass to 22-33% (KLECZEWSKI et al., 2012).

In this study, the endophytic fungi were isolated and identified, naturally occurring in stems of cultivars *P. maximum* and *P. purpureum* and explored their potential for inhibiting pathogenic fungi growth.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Plant material

Plant samples of different *P. maximum* cultivars were collected in August and September, 2012 and January, 2013. Sampling sites included three experimental fields, and seventeen different cultivars were sampled, six from UFLA, two from *Embrapa* Dairy Cattle and nine from *Embrapa* Beef Cattle (Table 1). The *P.purpureum* sample was collected from an experimental field in *Juiz de Fora* in September, 2012.

Healthy tillers were collected from each plant with approximately 10-15 cm of above ground tissues and were transported to the laboratory (BIOGEN-Bioprospecting and Fungal Genetics Laboratory of the Federal University of Lavras) at UFLA in plastic bags for the endophytic fungi isolation.

Table 1 Origin of cultivars samples *Panicum maximum* and *Pennisetum purpureum*

Location	Samples/ Cultivars
Embrapa Beef Cattle (CNPGC)/Campo Grande - MS	<i>P. maximum</i> cv. Mombaça
	<i>P. maximum</i> cv. Tanzânia
	<i>P. maximum</i> cv. Massai
	<i>P. maximum</i> cv. Aruana
	<i>P. maximum</i> cv. Gatton
	<i>P. maximum</i> cv. BRS Zuri
	<i>P. maximum</i> cv. Milênio
	<i>P. maximum</i> cv. Colônia
	<i>P. maximum</i> cv. Tobiata
	<i>P. maximum</i> cv. Mombaça
Federal University of Lavras (UFLA)/Lavras – MG	<i>P. maximum</i> cv. Vencedor
	<i>P. maximum</i> cv. Tanzânia
	<i>P. maximum</i> cv. Colônia
	<i>P. maximum</i> cv. Makueni
	<i>P. maximum</i> cv. Massai
Embrapa Dairy Cattle (CNPGL)/Juiz de Fora	<i>P. maximum</i> cv. Tanzânia
	<i>P. maximum</i> cv. Mombaça
	<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Mott.

## 2.2 Endophytic fungi isolation

The tillers were washed in running tap water and cut into 5-7 cm pieces. These pieces were taken to a laminar flow hood and surface-sterilized in series with sterile water, ethanol and sodium hypochlorite (sterile water for 1 min, 96% ethanol for 3 min, 5% sodium hypochlorite for 3 min and sterile water for 1 min) and then, surface-dried on sterile paper. The sterilized tissues were cut into small pieces (0.5 cm) with a sterile scalpel and plated on PDA plates amended with cefotaxime (250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The plates were incubated at 25°C and examined regularly for emerging fungal colonies, adapted by Kleczewski et al. (2012). Emerging fungal colonies from margins of sectioned tissues were subculture into PDA to generate pure cultures. Purified isolates were stored, long term, in sterile eppendorf tubes containing 1 mL in sterile water and kept at 4°C (CASTELLANI, 1967).

### **2.3 Morphological characterization and molecular identification of endophytic fungi**

Morphological characteristics of fungal isolates were used as an initial means of grouping fungi for identification. Pure culture isolates of endophytic fungi were examined at 40X and 100X with a light microscope. The following characters were used for the characterization and identification of morphospecies: colony appearance, mycelium color and structure, type of anamorph, conidiomata, conidia and conidiophore morphology (size, color, shape, ornamentation, etc.). Dichotomous keys were often sufficient to group fungi into genera-level designations. In cases where the endophyte isolate did not sporulate on PDA, they were grown in malt-extract-agar (MEA) to promote sporulation (GUO et al., 1998).

Sequencing of the region ITS and 18S (NS) of the rDNA was carried out for all isolates to confirm morphological identification and to identify non-sporulating fungi. The isolates from pure cultures were grown on PDA at 25°C for 7 days and genomic DNA was extracted from the mycelia mat using “Mobio” UltraClean® Microbial kit. The ITS and 18S (NS) amplification were carried out in 30 µL reactions containing 15 µL Quiagen kit, 12 µL of H<sub>2</sub>O, 1 µL reverse primer, 1 µL forward primer and 1 µL of genomic DNA. The amplification parameters were specific for each pair of primers used.

The ITS was amplified using ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) primers, the reaction conditions were as follows: 2 min for initial denaturation at 95°C, followed by 35 cycles of 1 min denaturation at 95°C, 1 min primer annealing at 50°C, 1 min extension at 72°C, with a final elongation for 7 min at 72°C. The NS was amplified using NS1(GTAGTCATATGCTTGCTC) and NS6



(GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC) primers, the reaction conditions were as follows: 1 min for initial denaturation at 94°C, followed by 35 cycles of 35s denaturation at 94°C, 50s primer annealing at 55°C, 2 min extension at 72°C, with a final elongation for 6 min at 72°C. The amplifications were performed in a "Programmable Thermal Controller-100 MJ Research, Inc." thermocycler.

The PCR products were sent to Macrogen to be purified and sequenced. Sequences were edited and assembled using SeqAssem software. Consensus regions were compared against GenBank's database using the Mega6 program. The closest hit sequences were then downloaded in FASTA format and aligned with the sequences produced for this study using Mega6 program.

#### **2.4 Antagonism against plant pathogenic fungi**

Eight crop-threatening pathogenic fungi, *Bipolarismaydis*, *Aspergillusochraceus*, *Penicilliumexpansum*, *Sclerotinia minor*, *Fusariumverticillioides*, *Drechsleramaydis*, *Pyriculariaoryzae* and *Colletotrichumgraminicola* were used as inhibition indicators in the study.

The endophytic fungi and the plant pathogens were cultivated for 7 days at 25°C on PDA. The endophytic fungi mycelia disks (5 mm in diameter) were transferred to PDA medium 7 days before inoculation with pathogens. The pathogens were inoculated 6 cm away from the endophytic colony. As a control, the pathogens were inoculated without the endophytic fungi colonies. After seven days of incubation at 25°C, the grown inhibition percentages of the pathogens were calculated in relation to the control. The tests were performed in triplicate (FÁVARO; SEBASTIANES; ARAÚJO, 2012).

Those endophytic fungi that inhibited growth of phytopathogenic fungi in the first test were inoculated into Petri dishes with the partition along with the phytopathogens to verify that inhibition was due to the presence of volatile

compounds or compounds secreted by the endophytic fungi in the culture medium (STROBEL et al., 2011).

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

For the endophytic fungi isolation PDA was used, that is a rich medium formulated to maximize overall fungal growth (LORO et al., 2012). Overall 118 fungi were isolated from the 11 different cultivars *P. maximum* and eight fungi were isolated from the cultivar *P. Purpureum*. Altogether 53 were isolated from the cultivars obtained in *Campo Grande*, 52 endophytic fungi were isolated from the cultivars obtained in *Lavras* and 21 were isolated from the cultivars obtained in *Juiz de Fora*. The maximum number of endophytes were isolated from the *Mombaça* cultivar (37), followed by the *Milênio* cultivar (30). No endophytic fungus was isolated from the *Gatton* cultivar from *Campo Grande*. After washing the surface samples with sterilized water, this water was placed on PDA plates. After incubation at 25°C for 1 week, no colony was found on the plates. This showed that epiphytes had been eradicated and the isolates were endophytes, present in plant tissues (TIAN et al., 2004). Although the methodology used is culture-dependent and slow growing and non-culturable fungi are unlikely to be isolated, a large number of fungi were achieved in this study (VEGA et al., 2010).

As indicated by morphological characteristics and molecular data, a great number of Ascomycota was isolated and just one Basidiomycota in samples *P. maximum*. Within the Ascomycota the most frequently isolated fungi genera were *Sarocladium* sp. (64) *Ramichloridium* sp. (12) and *Cercospora* sp. (6) (Figure 1 and 2).

The *Sarocladium* genus, found more often in our work, includes species that belonged to clades of *Acremonium strictum* and *A. bacillisporum* (SUMMERBELL et al., 2011). Many strains of this genus have been reported as endophytic, such as *S. spinificis* isolated from *Spinifex littoreus*, a grass found on the Taiwan coast (YEH; KIRSCHNER, 2014). *Spinifex kiliense* was isolated from

*Salvia miltiorrhiza* Bunge, an Asian medicinal plant (LOU et al., 2013). This genus has also been described to possess pathogenic species in rice (SUMMERBELL et al., 2011).

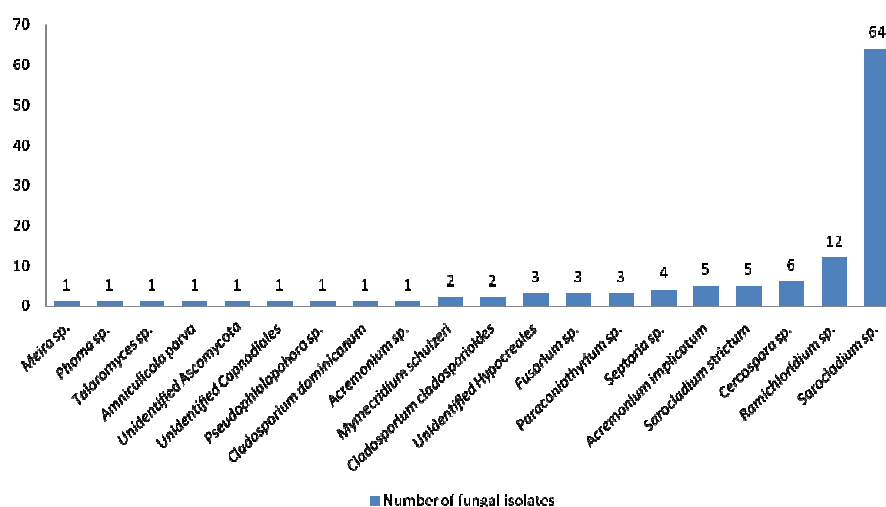


Figure 1 Number of isolates of fungal endophytic from *Panicum maximum*

*Ramichloridium*, another genus isolated in our work, is a heterogeneous group of anamorphic fungi including species with different lifestyles, such as saprobes and plant and human pathogens (ARZANLOU et al., 2007). Many species have been isolated as endophytic, like *R. pini* from Australian pine (*Pinus nigra*) in Slovenia (JURC et al., 1996), *R. cerophilum* from Camellia (*Camellia oleifera*) (ZHOU et al., 2013) and *R. apiculatum* from Artemisia (*Artemisia annua*) in China (YUAN; CHEN; MA, 2011).

The isolated Basidiomycota from *P. maximum* in this study was *Meirasp.*. This genus was originally isolated from mite bodies in citrus and can be found as endophytic in many plant species, such as bamboo and pear tree. It has been used as biological control against citrus mites and mildew (RUSH;

AIME, 2013). To the best of our knowledge, this is the first time that this genus has been isolated from *P. maximum*.

Other genera were isolated in low frequency in this study, such as *Phoma*, *Talaromyces*, *Pseudophialopohora*, *Mymecridium*, *Cladosporium*, *Fusarium* and *Sporisorium*, the unique Basidiomycota from *P. Purpureum* (Figure 1 and 2). In addition, in four isolates the identification only reached the level of order, Capniodiales, and one isolate reached only the phylum level, Ascomycota.

The *Paraconiothyrium* genus, also isolated in our work, is known for its ability to inhibit pathogen growth (COMBÈS et al., 2012). Species of this genus have been isolated as endophytes of various plants. *P. brasiliensis* was isolated from camphor (*Cinamonumcamphora*) and it inhibited the growth of seven fungal pathogens; among species inhibited highlight *Rhizoctoniasolani*, *Alternariaalternata* and *Fusariumgraminearum* (HAN et al., 2012). The species *P. variable*, isolated from *Cephalotaxusharringtonia*, inhibited the growth of *F. oxysporum* (COMBÈS et al., 2012). *Paraconiothyrium* sp. were isolated from soybean (*Glycine max*), pepper (*Capsicum annum*) and cucumber (*Cucumissativus*), and they produced a micotoxin that inhibited lettuce seed (*Lactuca sativa*) germination and rice grass (*Echinochloa crus-galli*), thus these isolates can be promising for weed control (KHAN et al., 2012).

Another genus found is the *Acremonium*, which has more than 200 species belonging at least three distinct orders of fungi, the *Hypocreales*, *Plectosphaerellaceae* and *Cephalothecaceae* (SUMMERBELL et al., 2011).

Many species of this genus are described as endophytic, living in their host without causing damage and even having antagonistic properties to plant pathogens (BURRUANO et al., 2008; GUNARATNA; BALASUBRAMANIAN, 1994). The genus *Acremonium*, *Phoma*, *Septoria* and *Fusarium* have been isolated as endophytic, as in *Panicumvirgatum* (GHIMIRE et al., 2011; KLECZEWSKI et al., 2012). However, to the best of our knowledge,

this is the first time that the genera *Ramichloridium*, *Paraconiothyrium*, *Sarocladium*, *Talaromyces*, *Mymecridium*, *Amniculicola*, *Pseudophialopohora* and *Cercospora* were isolated from *P. maximum*.

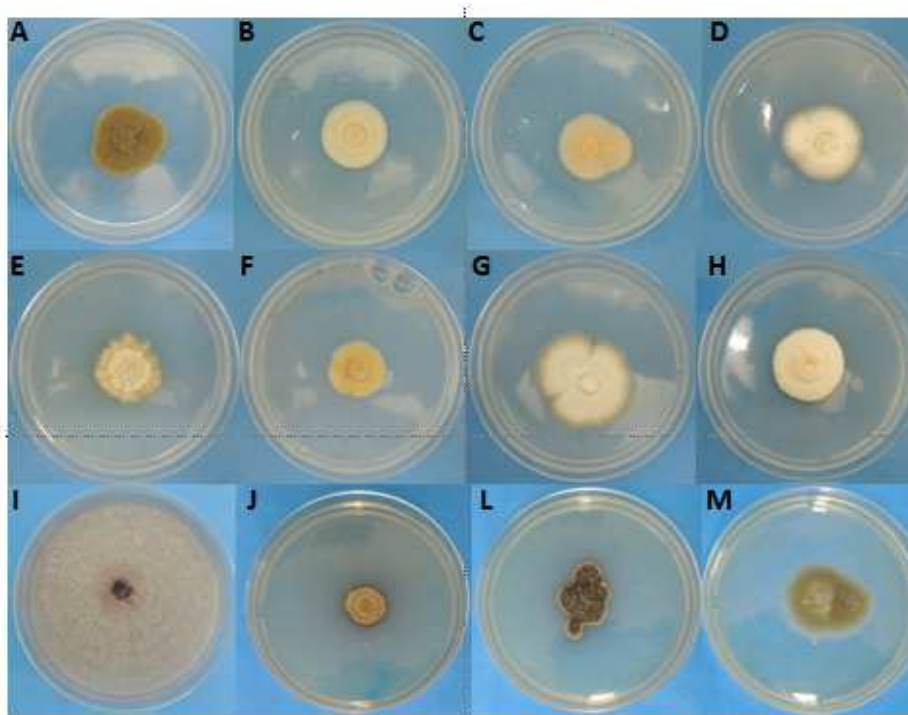


Figure 2 Morphology of some fungal isolates from *P. maximum*. A- *Cladosporium cladosporioides*; B- *Sarocladium strictum*; C- *Acremonium implicatum*; D- *Sarocladium* sp.; E- *Paraconiothyrium* sp.; F- *Phoma* sp.; G- *Talaromyces* sp.; H- *Sarocladium* sp.; I- *Fusarium* sp.; J- *Ramichloridium* sp.; L- *Cercospora* sp.; M- *Mymecridium schulzeri*

The majority of isolates from the *P. purpureum* samples belong to the genus *Sarocladium*, and just one Basidiomycota was obtained, *Sporisorium* sp. (Figure 3 and 4). This is the first report of *Paraconiothyrium*, *Sarocladium* and *Acremonium* as endophytic in this grass. Other genera like *Nigrospora* and

*Mucor* also have been isolated from *Pennisetum* sp. (PATEL et al., 2013), as well as the *Colletotrichum* genus from *P. purpureum* (MANAMGODA et al., 2013), which were not found in the *P. purpureum* samples in this work.

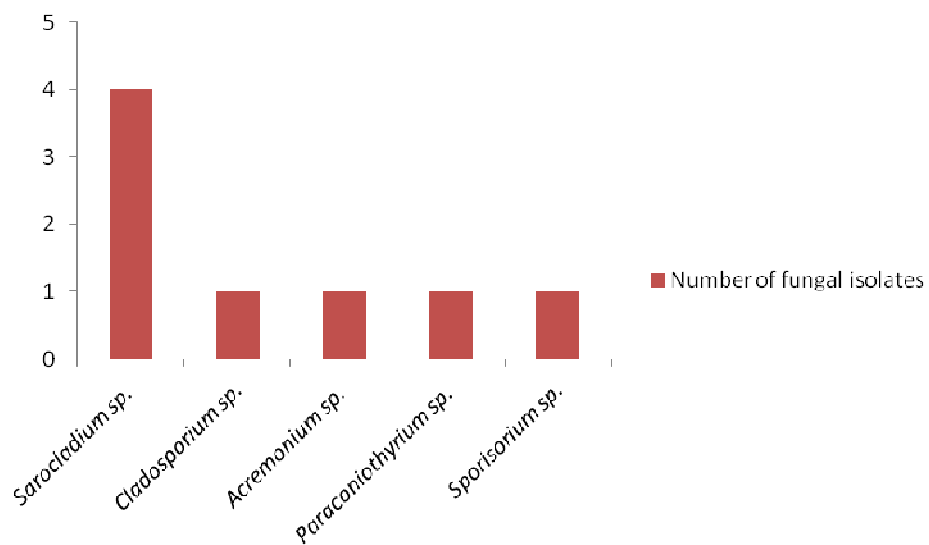


Figure 3 Number of isolates of fungal endophytic from *Pennisetum purpureum*

This is the first work with the endophytic grasses *P. maximum* and *P. purpureum* in Brazil, and the identification of the isolates contributes to increase the knowledge of endophytes in grasses in the country. In addition, genera not yet described as endophytic were isolated in these plant species, which may suggest greater community diversity in these endophyte forage plant species.

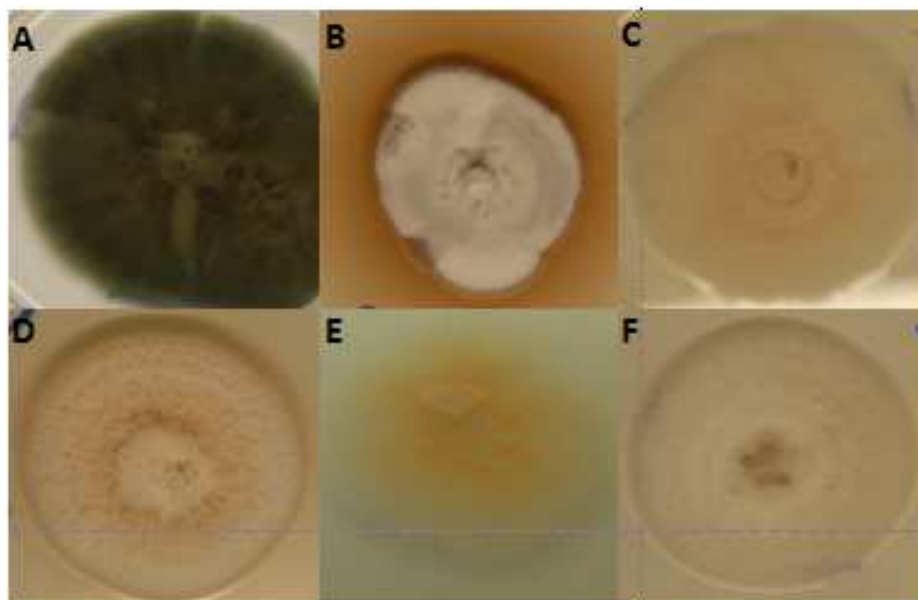


Figure 4 Different isolates from *P. purpureum*. A- *Cladosporium* sp.; B- *Sporisorium* sp.; C- *Paraconiothyrium* sp.; D- *Acremonium* sp. ; E and F - *Sarocladium* sp.

The antagonism assay showed that a total of 31 endophytic fungi (24.6%) reduced growth of some pathogenic fungi, these just one was isolated from *P. Purpureum*. The inhibition can be due to the presence of compounds secreted by the endophytic fungi in the culture medium. However, no inhibition was due to the presence of volatile compounds. The pathogenic fungi *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium verticillioides*, *Drechslera maydis*, *Pyricularia oryzae* and *Colletotrichum graminicola* were not inhibited by endophytic fungi.

Seven endophytic fungi showed activity against *Bipolaris maydis*. Among these, four isolates belong to the *Sarocladium* genera and the best result was 60.87% inhibition (Table 2). Out of the 31 isolates that showed *in vitro* antagonism, 29 showed activity against *Sclerotinia minor*. At least five different genera exhibit inhibition of this pathogen and the most common genera



was *Sarocladium*, probable due to the large number of isolates of this genus. The results ranged from 14 to 80% growth reduction (Figure 5) and the best results were obtained from fungi isolated from the Tobiatã and BRS Zuric cultivars, both from Campo Grande.

*Sarocladium*, the genus that showed the best inhibition results, has been studied in relation to its pathogenic fungi inhibition potential. *Sarocladium oryzae*, the cause of rice sheath rot, inhibited the mycelial growth of other pathogens that culture due to the Cerulenin production, an antifungal antibiotic. Among the pathogens inhibited were *Sclerotium oryzae* and *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*, causing stem rot and crown sheath rot, respectively (GNANAMANICKAM; MEW, 1991). This same fungus produced an extracellular metabolite with antifungal activity to *Magnaporthe oryzae*, the pathogen that causes rice blast, the main rice disease, the isolate is a promising strategy for the biological control of this disease (CÔRTEZ et al., 2012).

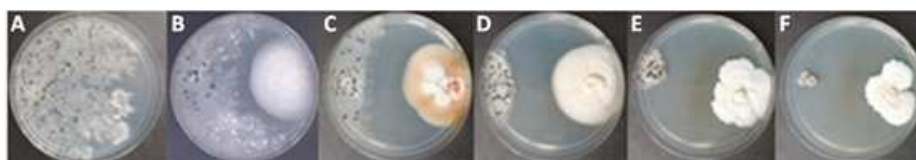


Figure 5 Inhibition of *S. minor* by endophytic fungi of the genus *Sarocladium*. A – *S. minor* (control), B, C, D, E and F – Different isolates of the genus *Sarocladium* inhibiting *S. minor*

One isolate belonging to the *Cercospora* genus showed activity against *Penicillium expansum* (29.41% inhibition). It was isolated from the Milênio cultivar from Campo Grande. Isolates of this genus also inhibited the growth of *Sclerotinia minor* up to 64%. *Cercospora* species have been studied for their potential to control weed growth. The species *Cercospora rodmani* is a mycoherbicide candidate for the water hyacinth control (*Eichhornia crassipes*), a weed. The fungus significantly reduced growth rates of the plant when

inoculated once during the early weed growth stage (CHARUDATTAN et al., 1985). The cercosporinphytotoxin, a secondary metabolite produced by a species of fungus, has a key role in pathogenicity, being an aggressive factor in the relation *Cercospora*-hyacinth (TESSMANN; CHARUDATTAN; PRESTON, 2008). *Cercospora* sp. isolated from the medicinal plant *Fallopia japonica*, produced six new guanacastanediterpenoids (Cercosporenes A-F). These terpenoids mediate inter and intraspecific antagonism (FENG et al., 2014). Although there are no reports of species of this genus with antifungal potential, our work showed that endophytic isolates *Cercospora* can be used for biological control.

Many endophytic fungi have shown antagonistic properties to plant pathogens and weeds. *Acremonium* species are antagonistic to pathogenic fungi (RAGAZZI et al., 1996). The species *Acremonium obclavatum* produced chitinase enzymes that inhibited germination and growth of the urediniosporal germ tube *Puccinia arachidis* causing peanut rust (GUNARATNA; BALASUBRAMANIAN, 1994). *Acremonium zeae*, isolated from maize, showed inhibition of *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus flavus* due to the production of antibiotic pyrrocidine (WICKLOW et al., 2005). In vitro tests with *Acremonium mucronatum* isolated from *Quercus cerris*, *Q. pubescens* and *Q. robur* showed growth inhibition of *Diplodiamutula*, a common pathogen *Quercus* (RAGAZZI et al., 1996). In our study, species of this genus isolated from Mombaça cultivar from Lavras and Tanzania cultivar from Juiz de Fora, inhibited the mycelial growth of *B. maydis* and *S. minor* by 55 and 60%, respectively.

Endophytic fungi continue to be sources of new metabolites with antibacterial, antifungal, antiviral and anticancer action, which are directly used in the pharmaceutical industry and agriculture (SURYANARAYANAN et al., 2009). Therefore, the results of this study are promising and may be exploited in

the future, in both in vivo tests and in the search for the compound(s) synthesized by fungal endophytes that may be used for biotechnological purposes.

Table 2 Antagonism test of the *Panicummaximum* and *Pennisetumpurpureum* endophytes against some phytopathogens

Pathogenic fungi	Identificationcode	Endophytic fungi	Growthreduction (%)
<i>B. maydis</i>	CG-TZ01	<i>Amniculicola parva</i>	22.41
	LA-VC01	<i>Sarocladium</i> sp.	27.59
	CG-TT01	<i>Sarocladiumstrictum</i>	41.38
	LA-MB01	<i>Sarocladium</i> sp.	44.82
	LA-MB02	<i>Acremoniumimplicatum</i>	55.55
	CG-ML01	UnidentifiedHypocreales	60.87
	CG-TT02	<i>Sarocladiumstrictum</i>	60.87
<i>P. expansum</i>	CG-ML02	<i>Cercosporasp.</i>	29.41
	CG-ML03	<i>Ramichloridium</i> sp.	14.28
<i>S. minor</i>	JF-MB01	<i>Sarocladium</i> sp.	16.66
	LA-MB03	<i>Sarocladium</i> sp.	19.04
	JF-MT01	<i>Sarocladium</i> sp. *	28.57
	CG-TB01	<i>Ramichloridium</i> sp.	30.36
	CG-TZ01	<i>Amniculicola parva</i>	33.77
	CG-ML04	<i>Cercosporasp.</i>	38.96

Table 2, conclusion

Pathogenic fungi	Identificationcode	Endophytic fungi	Growthreduction (%)
<i>S. minor</i>	LA-MB01	<i>Sarocladium</i> sp.	41.56
	CG-ML01	Unidentified Hypocreales	42.86
	CG-ML05	<i>Ramichloridium</i> sp.	43.21
	CG-ML06	<i>Ramichloridium</i> sp.	46.75
	CG-ML07	<i>Ramichloridium</i> sp.	46.75
	CG-ML08	<i>Sarocladium</i> sp.	48.21
	LA-TZ01	<i>Sarocladium</i> sp.	50.62
	LA-MB04	<i>Sarocladium</i> sp.	53.25
	LA-MB05	<i>Sarocladium</i> sp.	53.25
	CG-ML09	<i>Cercosporasp.</i>	53.57
	CG-TT03	<i>Sarocladium</i> sp.	55.36
	LA-MB06	<i>Sarocladium</i> sp.	57.14
	JF-TZ01	<i>Acremonium</i> sp.	59.74
	CG-ML10	<i>Cercosporasp.</i>	64.29
	LA-VC01	<i>Sarocladium</i> sp.	67.53
	CG-TT04	<i>Sarocladium</i> sp.	67.86
<i>S. minor</i>	CG-TT05	<i>Sarocladium</i> sp.	67.86
	CG-TB02	<i>Sarocladium</i> sp.	75.00
	CG-TT06	<i>Sarocladium</i> sp.	80.36
	CG-TT07	<i>Sarocladium</i> sp.	80.36

\*Isolate from *Pennisetum purpureum*

LA – Lavras, JF - Juiz de Fora, CG - Campo Grande; MB – Mombaça, VC – Vencedor, TZ – Tanzânia, TT – BRS Zuri, ML – Milênio, TB – Tobiata, MT – Mott

#### 4 CONCLUSION

This is the first work with the endophytic grasses *P. maximum* and *P.purpureum* in Brazil. The fungal isolates belong to the phylum Ascomycota and Basidiomycota. The *Sarocladium* genus showed a higher number of isolates. Of the fungal isolates, 31 showed antifungal activity against some pathogenic fungi. *The best result was obtained with the isolated Sarocladium genus that inhibited by 80% the growth of Sclerotinia minor.* The compound(s) which inhibited the plant phytopathogenic fungus was synthesized in the culture medium. The identification of the isolates contributes to increase the knowledge of endophytes in grasses in the country.

Acknowledgments: We would like to thank the professors and researchers of the Federal University of Lavras (UFLA), Embrapa Beef Cattle - CNPGC (Campo Grande-MT), Embrapa Dairy Cattle- CNPGL (Juiz de Fora-MG) for providing the samples used in this work. We would also like to thank Fapemig, CNPq and CAPES for financial support.

## REFERENCES

- ARRANLOU, M. et al. Phylogenetic and morphotaxonomic revision of *Ramichloridium* and allied genera. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 58, p. 57-93, 2007.
- BRAZ, A. J. B. P. et al. Emergência de plantas daninhas em lavouras de feijão e de trigo após o cultivo de espécies de cobertura de solo. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 621-628, 2006.
- BURRUANO, S. et al. **Interaction between Acremonium mycelium and Plasmopara viticola in Vitis vinifera**. *Phytopathologia Mediterranea*, Bologna, v. 47, n. 2, p. 122-131, Aug. 2008.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. **Further Researches Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 42, p. 181-184, 1967.
- CHARUDATTAN, R. et al. **Biocontrol efficacy of Cercospora rodmanii on water hyacinth**. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 75, p. 1263-1269, 1985.
- CLAY, K.; CHEPLICK, G. P.; MARKS, S. Impact of the fungus *Balansia henningsiana* on *Panicum agrostoides*: frequency of infection, plant growth and reproduction, and resistance to pests. **Oecologia**, Berlin, v. 80, p. 374-380, 1989.
- COMBÈS, A. et al. Chemical communication between the endophytic fungus *Paraconiothyrium variabile* and the Phytopathogen *Fusarium oxysporum*. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, Oct. 2012. Available from: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0047313>>. Access in: 10 Dec. 2014.
- CÔRTEZ, M. V. C. B. et al. **Inibição do desenvolvimento micelial de Magnaporthe oryzae por metabólito extracelular produzido por Sarocladium oryzae**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2012. 12 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 37).
- DIAS, M. C. L. L.; ALVES, S. J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 152-158, 2008.

DINARDO, W. et al. Efeito da densidade de plantas de *Panicum maximum* Jacq. sobre o crescimento inicial de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 59-68, dez. 2003.

FAVARO, L. C. L.; SEBASTIANES, F. L. S.; ARAÚJO, W. L. Epicoccum nigrum P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 6, 2012. Available from: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0036826>>. Access in: 10 Dec. 2014.

FENG, Y. et al. Guanacastane Diterpenoids from the Plant Endophytic Fungus *Cercospora* sp. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 77, n. 4, p. 873-881, Feb. 2014.

GHIMIRE, S. R. et al. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 47, n. 1, p. 19-27, Mar. 2011.

GNANAMANICKAM, S. S.; MEW, T. W. Interactions between *Sarocladium oryzae* and stem attacking fungal pathogens of rice. **Plant and Soil**, The Hague, v. 138, n. 2, p. 213-219, Dec. 1991.

GUNARATNA, K. R.; BALASUBRAMANIAN, R. Partial purification and properties of extracellular chitinase produced by *Acremonium obclavatum*, an antagonist to roundnut rust, *Puccinia arachidis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 342-345, May 1994.

GUO, H. et al. Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. **Science**, New York, v. 279, n. 5355, p. 1360-1363, Feb. 1998.

GUPTA, P. et al. Isolation and characterization of endophytes from different plants: effects on growth of *Pennisetum typhoides*. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, New Delhi, v. 11, n. 1, p. 223-234, 2014.

HAN, M. et al. A new endophytic *Paraconiothyrium brasiliense* LT161 shows potential in producing antifungal metabolites against phytopathogens. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 6, n. 50, p. 7572-7578, Dec. 2012.



- JURC, M. et al. **Air pollution and fungal endophytes in needles of Austrian pine.** *Phyton*, Horn, v. 36, n. 3, p. 111-114, 1996.
- KHAN, A. L. et al. The Newly isolated endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. LK1 Produces Ascotoxin. **Molecules**, Basel, v. 17, n. 1, p. 1103-1112, Jan. 2012.
- KLECZEWSKI, N. M. et al. A survey of endophytic fungi of switchgrass (*Panicumvirgatum*) in the Midwest, and their putative roles in plant growth. **Fungal Ecology**, New York, v. 5, n. 5, p. 521-529, Oct. 2012.
- LÉDO, F. J. D. S. et al. Estimativas de repetibilidade para caracteres forrageiros em *Panicummaximum*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1299-1303, jul./ago. 2008.
- LIMA, E. S. et al. Características agrônômicas e nutritivas das principais cultivares de capim-elefante do Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 324-334, 2010.
- LORO, M. et al. Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. **Journal of Arid Environments**, London, v. 85, p. 46-55, Oct. 2012.
- LOU, J. et al. Endophytic fungi from medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* Bunge and their antimicrobial activity. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 7, n. 47, p. 5343-5349, Nov. 2013.
- MANAMGODA, D. S. et al. **Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*.** *Fungal Diversity*, Hong Kong, v. 61, n. 1, p. 107-115, July 2013.
- NAIK, B. S. et al. *Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro.* **Microbiology Research**, Rosemead, v. 164, n. 3, p. 290-296, 2009.
- NDEMAH, R. et al. Species composition and seasonal dynamics of lepidopterous stem borers on maize and the elephant grass, *Pennisetumpurpureum*(Moench) (Poaceae), at two forest margin sites in Cameroon. **African Entomology**, Pretoria, v. 8, n. 2, p. 265-272, 2000.
- PATEL, C. et al. Studies on biodiversity of fungal endophytes of indigenous monocotaceous and dicotaceous plants and evaluation of their enzymatic potentialities. **International Journal of Scientific and Research Publications**, New Delhi, v. 3, n. 7, p. 1-5, July 2013.

PETRINI, O. Fungal endophytes in tree leaves. In: ANDREWS, J. H.;HIRANO, S. S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer, 1991. p. 179-197.

QUEIROZ, C. A. et al. Reação de acessos e cultivares de *Brachiaria* spp. e *Panicum maximum* à *Pratylenchus brachyurus*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 40, n. 3, p. 226-230, 2014.

RAGAZZI, A. et al. Antagonismo f *Acremonium mucronatum* towards *Diplodiamutilla* in tests in vitro and in situ. **European Journal of Forestry Pathology**, Cambridge, v. 26, n. 5, p. 235-243, Oct. 1996.

RUSH, T. A.; AIME, M. C. The genus Meira: phylogenetic placement and description of a new species. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 103, n. 5, p. 1097-1106, 2013.

STROBEL, G. A. et al. Volatile antimicrobials from *Muscodora albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, New York, v. 147, n. 11, p. 2943-2950, Nov. 2011.

SUMMERBELL, R. C. et al. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 68, p. 139-162, Mar. 2011.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, New York, v. 23, n. 1/2, p. 9-19, Feb./Mar. 2009.

TESSMANN, D. J.; CHARUDATTAN, R.; PRESTON, J. F. Variability in aggressiveness, cultural characteristics, cercosporin production and fatty acid profile of *Cercosporapiaropi*, a biocontrol agent of water hyacinth. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 57, n. 5, p. 957-966, Oct. 2008.

TIAN, X. L. et al. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 303-309, Apr. 2004.

VEGA, F. E. et al. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico, and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, New York, v. 3, n. 3, p. 122-138, Aug. 2010.

WICKLOW, D. T. et al. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 5, p. 610-618, May 2005.

YEH, Y. H.; KIRSCHNER, R. *Sarocladium spinificis*, a new endophytic species from the coastal grass *Spinifex littoreus* in Taiwan. **Botanical Studies**, Minneapolis, v. 55, p. 1-6, Feb. 2014.

YUAN, Z. L.; CHEN, Y. C.; MA, X. J. Symbiotic fungi in roots of *Artemisia annua* with special reference to endophytic colonizers. **Plant Biosystem**, Firenze, v. 145, n. 2, p. 495-502, June 2011.

ZHOU, S. L. et al. Detection of endophytic fungi within foliar tissues of *Camellia oleifera* based on rDNA ITS sequences. **Mycosystema**, Beijing, v. 32, n. 5, p. 819-830, 2013.