



BÁRBARA TEMPONI VILARINO GODINHO

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E
ANTAGONISMO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
DE *Eremanthus* sp.**

LAVRAS-MG

2016

BÁRBARA TEMPONI VILARINO GODINHO

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ANTAGONISMO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DE *Eremanthus* sp.**

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

Orientadora

Dra. Patrícia Gomes Cardoso

LAVRAS-MG

2016

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

Godinho, Bárbara Temponi Vilarino.

Isolamento, identificação e antagonismo de fungos endofíticos
de *Eremanthus* sp. / Bárbara Temponi Vilarino Godinho. – Lavras :
UFLA, 2016.

47 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)—Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador(a): Patrícia Gomes Cardoso.

Bibliografia.

1. Antagonismo. 2. Screening. 3. Inibição. 4. Cryptosporiopsis.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

BÁRBARA TEMPONI VILARINO GODINHO

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ANTAGONISMO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DE *Eremanthus* sp.**

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

APROVADA em 26 de fevereiro de 2016.

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros	UFLA
Dr. Lucas Magalhães de Abreu	UFV

Dra. Patrícia Gomes Cardoso

Orientadora

LAVRAS – MG

2016

A minha família, por ser meu pilar, fonte das minhas forças,

DEDICO

Agradecimentos

A Deus, pela força, fé e conquistas alcançadas.

Aos meus pais e meus irmãos, pelo amor e apoio incondicionais.

Ao meu namorado, pelo carinho, amor, atenção, ajuda, conselhos e companheirismo sempre!

A todos os meus amigos, que me aguentaram nos dias mais difíceis, Naty, Mônica, Juh, Annayara, Déborah, Anna, Pri, amigos do laboratório Biogen e Jorge.

Aos meus tios, que sempre me apoiaram e incentivaram minha busca por mais conhecimento e formação.

A minha orientadora, Patrícia Gomes Cardoso, pela grande oportunidade, por ter aceitado o desafio de me orientar, pelo respeito, aprendizado, paciência e amizade construída. Muito Obrigada!

À professora Roberta, pela ajuda, disposição e por ter cedido seu laboratório para realização de parte do nosso trabalho.

A todos os professores que tive a oportunidade de conhecer durante as disciplinas.

A todos os membros da banca, pela contribuição para este trabalho.

Aos laboratoristas da Universidade, Paulinho e Ivani, pela disposição.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro ao projeto.

À Capes, pelo apoio financeiro, por meio da concessão da bolsa de estudos.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

Muito obrigada!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

Grande parte dos vegetais vive em simbiose com microrganismos que podem viver em sua superfície (epifíticos) ou em seu interior (endofíticos). Muitos destes microrganismos produzem compostos secundários que podem proteger o hospedeiro ou induzir alguma resposta de defesa da planta. Os microrganismos produtores de tais substâncias são explorados como agentes de biocontrole contra insetos, ervas daninhas, fungos fitopatogênicos e bactérias patogênicas. Dessa forma, o objetivo neste trabalho foi isolar e identificar fungos endofíticos de *Eremanthus* sp. e verificar se eles apresentam atividade antagonista contra fungos fitopatogênicos e bactérias patogênicas. Foram isolados fungos endofíticos de três áreas da Serra da Bocaina em Minas Gerais, em três condições diferentes com interação humana (área 1), em seu habitat natural (área 2) e plantação planejada (área 3). Os fungos endofíticos encontrados foram identificados por meio do sequenciamento da região ITS e submetidos a testes de antagonismo *in vitro*. No teste contra bactérias, os filtrados de cada fungo endofítico foram separados e foi utilizada a metodologia de difusão em disco. Nenhum filtrado apresentou ação inibidora contra as bactérias. No pareamento dos fungos endofíticos contra os fitopatógenos utilizados fungos dos gêneros *Cryptosporiopsis*, *Diaporthe*, *Xylaria*, *Paraconiothirium* e *Camarosporium* apresentaram antibiose por difusão de substâncias no meio. Neste trabalho é relatado pela primeira vez o isolamento de doze gêneros de fungos filamentosos em *Eremanthus* sp. além de verificar a capacidade antagonista de tais fungos, o que abre caminho para a descoberta das substâncias produzidas pelos fungos endofíticos que possam ser utilizados no controle desses patógenos.

Palavras-chave: *Cryptosporiopsis*. Antagonismo. *Screening*. Inibição.

ABSTRACT

Many plants live in symbiosis with microorganisms that can live on their surface (epiphytic) or interior (endophytic). Many of these microorganisms produce secondary metabolites that can protect the plant or induce some host defense response. Moreover, the microorganisms that produce such substances have been explored as biocontrol agents against insects, weeds, plant pathogenic fungi and pathogenic bacteria. Thus, the aim of our study was to isolate endophytic fungi *Eremanthus* sp. and check if they have antagonistic activity against fungal pathogens of plants and pathogenic bacteria. The endophytic fungi were isolated from three areas of the Serra da Bocaina in Minas Gerais, in three different conditions; with human interaction (Area 1), in their natural habitat (Area 2) and in planned planting (Area 3). The endophytic fungi found were identified by sequencing of the ITS region and subjected an *in vitro* antagonism test. The antagonisms that show antibiosis were submitted to tests on split plates to verify the volatile compound production. In the test against bacteria, filtrates of each endophytic fungus were separated and applied in the disk diffusion method. Endophytic fungus filtrate showed no inhibitory action against bacteria. In the pairing of endophytic fungi against the pathogens used fungi of the genera *Cryptosporiopsis*, *Diaporthe*, *Xylaria*, *Paraconiothirium* and *Camarosporium* presented antibiosis by releasing compounds in the medium. This paper is the first report on the isolation of twelve genera in *Eremanthus* sp. besides verifying their antagonist capacity such fungi, which opens the way for the discovery of the substances produced by the endophytic fungi that inhibit pathogens.

Keywords: *Cryptosporiopsis*. Screening. Inhibition. Antagonism.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1. Fungos endofíticos.....	12
2.2. Controle Biológico.....	13
2.3. Fungos endofíticos aplicados no biocontrole	14
2.4. O Gênero <i>Eremanthus</i>	17
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	26
ARTIGO 1. ISOLATION, IDENTIFICATION AND ANTAGONISM OF ENDOPHYTIC FUNGI FROM <i>Eremanthus</i> sp.....	27
1. INTRODUCTION	27
2. MATERIAL AND METODS.....	28
2.1. Plant material.....	28
2.2. Endophytic fungi isolation	29
2.3. Molecular identification of isolated fungi	29
2.4. Antibacterial activity of supernatant of isolated fungi	30
2.5. Antifungal activity of endophytic fungi isolated	31
3. RESULTS AND DISCUSSION	31
4. CONCLUSIONS	40
5. REFERENCES.....	41

1. INTRODUÇÃO

Grande parte dos seres vivos, especialmente vegetais, vive em associação com outros organismos. Tais organismos podem ser fungos filamentosos, bactérias, leveduras, vírus, algas ou nematoides, sendo que alguns destes se localizam tanto no interior (endofíticos) quanto no exterior da planta (epifíticos).

Plantas hospedeiras de fungos endofíticos são mais produtivas devido à resistência induzida contra fungos patogênicos, insetos e nematoides, além de apresentarem grande tolerância a condições climáticas adversas, como altas temperaturas e a seca. Além dessas vantagens para a planta, alguns endofíticos produzem metabólitos secundários como os alcaloides que têm sido relacionados à intoxicação animal.

Os metabólitos secundários produzidos por microrganismos apresentam grande importância à humanidade, devido às atividades antibióticas e de importância farmacêutica, bem como atividades imunossupressoras e tóxicas. Produtos naturais bioativos de fungos endofíticos, isolados de plantas superiores, estão ganhando importância considerável para produtos farmacológicos, agroindustriais, de tecnologia ambiental e bioconversão.

Quase a totalidade das espécies vegetais já estudadas possui uma microbiota endofítica, porém algumas espécies de plantas têm sido pouco estudadas, como é o caso da *Eremanthus* sp., popularmente conhecida como candeia. Esta árvore superior pertence à família Asteraceae, é explorada principalmente para produção de moirões de cercas, além disso, dela é extraído o alfa-bisabolol, óleo que contém propriedades dermatológicas, antimicrobianas e espasmódicas. A associação da candeia com microrganismos endofíticos tem sido pouco explorada e pode apresentar resultados interessantes em relação às espécies presentes e ao potencial biotecnológico.

Dessa forma, o objetivo neste trabalho foi identificar gêneros de fungos endofíticos presentes nestas plantas, assim como avaliar o potencial de inibição destes isolados contra fungos e bactérias patogênicas, uma vez que as candeias produzem o óleo alfa-bisabolol com propriedades antimicrobianas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Fungos endofíticos

O termo endofítico é frequentemente utilizado para descrever a microbiota interna das plantas vivas (STONE; BACON; WHITE, 2000). Uma definição mais recente de fungos endofíticos, proposta por Azevedo e Araújo (2007), estabelece tais microrganismos como aqueles que podem ou não crescer em meios de cultura e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízo aparente ao seu hospedeiro, além de não produzirem estruturas externas emergindo dos vegetais. Eles são encontrados nas partes aéreas vegetais e/ou nas raízes, que é uma das principais portas de entrada dos mesmos e diferem dos epifíticos que vivem na superfície das plantas (ARAÚJO, 2001; KONIG et al., 1999). Podem ser isolados de plantas de florestas tropicais, temperadas, boreais e até mesmo de ambientes árticos e desérticos (STONE; BACON; WHITE, 2000).

A convivência entre fungo e planta é caracterizada como associação mutualística, uma vez que os organismos envolvidos sobrevivem assintomaticamente à associação e ambos são beneficiados. Por parte do fungo, ele recebe nutrição e abrigo da planta hospedeira, enquanto essa aumenta sua capacidade competitiva e sua resistência contra fatores bióticos (CLAY; SHARDL, 2002) e abióticos (SAIKKONEN et al., 1998; SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004). Além disso, o fungo também é beneficiado quando ocorre disseminação à próxima geração do hospedeiro, por meio de transmissão vertical (FAETH; FAGAN, 2002; MULLER; KRAUSS, 2005).

Os fungos endofíticos foram descritos pela primeira vez por Bary (1866), porém durante mais de um século, foram quase que ignorados, principalmente devido ao pouco conhecimento sobre suas reais funções no interior dos vegetais e também por não produzirem estruturas externas visíveis em seus hospedeiros. Em geral, os fungos adentram as plantas por

aberturas naturais, como estômatos e hidatódios ou feridas causadas por insetos, por estruturas de fungos patogênicos, como os apressórios ou mecânicas e também podem ser transmitidos via sementes.

Na maioria dos casos estudados, as interações entre plantas e microrganismos têm se mostrado benéficas e podem estar relacionadas à sanidade vegetal, já que atuam no controle do crescimento de microrganismos patogênicos, inibem a herbivoria por insetos, além de outras ações, que em conjunto, aumentam a capacidade adaptativa da planta (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; VARMA; SUDHA; FRANKEN, 1999).

Além de ser fonte alternativa dos metabólitos secundários conhecidos das plantas, fungos endofíticos produzem uma rica variedade de outros ativos biológicos e produtos estruturalmente diversos nunca antes encontrados na natureza (GUNATILAKA, 2006; STROBEL; DAISY, 2003; STROBEL et al., 2004; TAN; ZOU, 2001; VERMA; KHARWAR; STROBEL, 2009; ZHANG; SONG; TAN, 2006) e são de grande importância para a descoberta de drogas ou compostos utilizados na agricultura (MITCHELL et al., 2008; STROBEL, 2006a, 2006b).

Produtos naturais obtidos a partir de microrganismos endofíticos têm mostrado atividade antimicrobiana e, em muitos casos, atuam como proteção da planta hospedeira contra microrganismos fitopatogênicos (GUNATILAKA, 2006). Assim, fungos endofíticos são considerados importantes fontes para triagem de agentes de biocontrole para suprimir pragas de plantas, como insetos e patógenos, e para superar estresses abióticos como a seca, o pH e temperatura adversos (BACKMAN; SIKORA, 2008).

2.2. Controle biológico

Os termos “controle biológico” e seu sinônimo “biocontrole” têm sido usados em diferentes áreas da biologia, especialmente em entomologia e patologia de plantas (PAL; GARDENER, 2006).

De acordo com Lima, De Marco e Félix (2000), o controle biológico é fundamentado nas interações antagônicas que ocorrem entre as espécies. As interações mais estudadas e melhor caracterizadas são aquelas que envolvem fungos fitopatogênicos e seus antagonistas (CHET, 1992; HARAN et al., 1996). Segundo estes autores, o fungo agente de controle biológico interfere na vida do fitopatógeno por diversos mecanismos de ação, como a competição por espaço e nutrientes, antibiose (produção de substâncias voláteis ou não) (AHMED et al., 2003), micoparasitismo (liberação de enzimas e morte de um dos microrganismos envolvidos), predação, hipovirulência ou por indução de resistência, entre outros.

Pal e Gardener (2006) afirmam que, com relação às doenças de plantas, a supressão pode ser realizada de muitas maneiras. Se as atividades dos produtores são consideradas práticas relevantes, tais métodos como o uso de rotações e plantio de cultivares resistentes a doenças (sejam naturalmente selecionadas ou geneticamente modificadas) seriam incluídos na definição. Porque a planta hospedeira responde a numerosos fatores biológicos, ambos, a resistência do hospedeiro induzida pelo patógeno ou não patógeno, pode ser considerada uma forma de controle biológico. Mas, de forma mais restrita, tais autores afirmam que o controle biológico refere-se à utilização intencional de organismos vivos, introduzidos ou residentes, para suprimir as atividades e populações de um ou mais patógenos de plantas.

2.3. Fungos endofíticos e suas aplicações

A partir da síntese de metabólitos secundários, os fungos podem ter vantagens em habitats, nos quais estes necessitam competir com outros microrganismos. Para tanto, muitos desses metabólitos atuam de forma tóxica e podem inibir outros organismos (KHALDI et al., 2010). Devido a essas propriedades bioativas, muitos destes compostos têm sido adotados para o uso farmacêutico como os antibióticos, agentes hipocolesterolemiantes, inibidores tumorais e imunossupressores, sendo que,

poucos metabólitos secundários não apresentam atividade antibiótica (DEMAIN, 1999; SHWAB; KELLER, 2008).

Dentre alguns estudos já realizados com fungos endofíticos, Dai et al. (2009) analisaram quimicamente o extrato de cultura de *Nodulisporium* sp. (Xylariaceae), isolados da planta arbórea Erica (Ericaceae) das Ilhas Canárias e determinaram que esses isolados produzem seis novos metabólitos. As propriedades antibacterianas, antifúngicas e algicidas, das seis substâncias, foram testadas em ensaio de difusão em ágar e comparadas com antibióticos convencionais. Todas as substâncias apresentaram atividade antifúngica e algicidas e três exibiram também ação antibacteriana.

Em outro trabalho o fungo endofítico *Phomopsis* sp. (Valsaceae), isolado de folhas de *Laurus azorica* (Lauraceae), que cresce na ilha Gomera, produziu outros seis metabólitos. Dentre os compostos isolados, os novos metabólitos cicloepoxytriol B e cicloepoxylactona mostraram atividades antibacterianas e antifúngicas contra *Bacillus megaterium* e *Microbotryum violaceum* (HUSSAIN et al., 2009).

Visto que os fungos endofíticos são fontes de metabólitos secundários antimicrobianos, estes podem ser testados como antagonistas de fungos fitopatógenos como espécies de *Fusarium*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phytophthora* sp. Tais fungos são agentes etiológicos de inúmeras doenças. *Fusarium* spp. causam infecções oportunistas em humanos e animais (DE SILVA; PERERA, 1997; MUHAMMED et al., 2013; RANAWAKA; DE SILVA; RAGUNATHAN, 2012). Em plantas eles causam podridão da raiz e murcha do *Fusarium* em diversas culturas, sendo encontrados em solo de inúmeras áreas de cultivo pelo Brasil (TOLEDO-SOUZA et al., 2009). *Sclerotinia sclerotiorum* provoca doenças conhecidas como mofo-branco, podridão da Sclerotinia, podridão da cabeça por Sclerotinia, podridão do colmo ou murcha em muitas culturas (WANG et al., 2014). *Colletotrichum lindemuthianum* é causador da

podridão amarga e da antracnose, a última está espalhada em muitas áreas de cultivo de feijão, mas prevalece em regiões subtropicais e temperadas e pode ser transmitida por meio da semente infectada (PASTOR-CORRALES; TU, 1989). *Phytophthora* sp. é um gênero de patógenos de plantas que infecta quase todas as espécies de plantas (HANSEN; REESER; SUTTON, 2011) e causa ferrugem e o *damping-off* (ZOHARA et al., 2016).

O biocontrole de patógenos de plantas proporciona um meio alternativo de reduzir o incidente de doenças de plantas sem o aspecto negativo dos controles químicos, como pesticidas (CHET, 1987). Fungicidas químicos são caros, podem causar poluição ambiental e induzir resistência no patógeno (LARSON, 1987; JONES, 1985). Adicionalmente, eles podem causar nanismo e clorose em mudas (JONES, 1985).

Da mesma forma que fungos endofíticos são estudados na inibição de fitopatógenos, também são utilizados no antagonismo de bactérias patogênicas. Entretanto, encontrar um antagonista se torna mais difícil pelo uso indiscriminado de antibióticos, que é acompanhado da seleção das bactérias resistentes, fato que leva ao aumento das patologias. Tentando contornar este problema deve-se alcançar o equilíbrio entre o aumento da resistência microbiana e o número de novos antibióticos produzidos (SILVA, 2010).

Algumas bactérias patogênicas de importância incluem *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* Enteritidis. *Staphylococcus aureus* é a causa mais comum de infecções estafilocócicas como espinhas, impetigo, meningite, osteomielite, endocardite e septicemia. É capaz de secretar diferentes tipos de toxinas que estão associadas a doenças específicas (DING et al., 2016). *Escherichia coli* Enterotoxigênica está associada com diarreia dos viajantes em países de risco e em crianças abaixo de dois anos de idade, podendo levar à morte (HAINES et al., 2015). *Listeria monocytogenes* foi reconhecida

como importante agente patogênico de origem alimentar, causando listeriose em humanos. Manifestações clínicas de listeriose invasiva normalmente são graves e incluem aborto, sepse e meningoencefalite e síndrome gastroenterite febril (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). *Salmonella enterica* Enteritidis é uma das principais causas de doença intestinal pelo mundo, assim como agente etiológico de doenças sistêmicas mais severas, como febre tifoide e paratifoide (POND, 2005).

Todas as espécies acima são consideradas de grande risco devido às severas infecções que provocam em todo o mundo. Dessa forma, a resistência microbiana a medicamentos e o uso excessivo destes, apenas pioram a situação (AKSOY; UNAL, 2008). Portanto, é necessária a contínua busca por antimicrobianos efetivos no tratamento de doenças infecciosas (XING et al., 2011).

2.4.O Gênero *Eremanthus*

Espécies de *Eremanthus*, também conhecidas como candeia, são da família Asteraceae, pertencem ao grupo ecológico das pioneiras e são consideradas precursoras na invasão de campos (CARVALHO, 1994). O tronco dessa árvore possui casca grossa com muitas fendas e frustes e, nos galhos mais novos, a casca torna-se menos rústica. As folhas têm como característica marcante a dupla coloração. Na parte superior são verdes e glabras e na parte inferior possuem tom branco, tomentoso e são aveludadas (CORRÊA, 1931). As folhas são simples, opostas com pilosidade cinérea (CHAVES; RAMALHO, 1996). As flores são hermafroditas e se apresentam em inflorescência e cor púrpura nas extremidades dos ramos (ARAÚJO, 1944). As características das folhas e de inflorescência facilitam a identificação da espécie mesmo à distância. As flores se desenvolvem em março, abrem de maio a agosto e o pico de floração é no mês de julho quando alguns indivíduos já frutificam, com pico de frutificação entre os meses de setembro e outubro, quando se inicia a dispersão de sementes ou

aquênios (CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS - CETEC, 1994).

De acordo com CETEC (1994), plantas desse gênero desenvolvem em sítios com solos pouco férteis, rasos e, predominantemente, em áreas de campos de altitude, com estas variando entre 1000 e 1700m. A candeia se desenvolve em locais nos quais seria difícil a implantação de culturas agrícolas ou mesmo a implantação de alguma outra espécie florestal.

Existem várias espécies de candeia, porém a *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish e a *Eremanthus incanus* (Less.) Less são as de maior importância econômica e de maior ocorrência em Minas Gerais, com distribuição do sudeste ao nordeste do Planalto Central do Brasil. A planta está presente no cerrado, na floresta secundária ou na caatinga.

As espécies *E. erythropappus* e *E. incanus* são as mais comumente utilizadas para a extração de óleo essencial com geração de renda (SCOLFORO; OLIVEIRA; DAVIDE, 2004), além da madeira ser comumente utilizada para moirões de cerca (TEIXEIRA et al., 1996). Por este fato, a candeia é a única espécie arbórea do Brasil com legislação própria para exploração (LINHARES, 2011). Até 2004 não existia plano de manejo para *Eremanthus* sp., e este foi desenvolvido pelo Laboratório de Manejo Florestal da Universidade Federal de Lavras, a fim de possibilitar constante revitalização dos candeiais e impedir que eles sejam substituídos por alguma cultura pouco rentável ou até mesmo pastagem.

REFERÊNCIAS

AHMED, A. S. et al. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 633-637, 2003.

AKSOY, D. Y.; UNAL, S. New antimicrobial agents for the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 14, p. 411–420, 2008.

ARAÚJO, L. C. *Vanillosmopsis erythropappa* (DC) Sch.Bip: sua exploração florestal. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1944. 58 p.

ARAÚJO, W. L. Micro-organismos endofíticos no controle biológico. In: REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS, 7., 2001, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2001. p. 136.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC, 2007. p. 189-207.

BARY, A. Holmeister's handbook of physiological botany. In: _____. **Morphologie physiologie der Pilze. Flechten, und Myxomyceten**. Leipzig: Engelmann, 1866.

BACKMAN, P. A.; SIKORA, R. A. Endophytes: an emerging tool for biological control. **Biological Control**, San Diego, v. 46, p. 1–3, 2008.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 640 p.

CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Memória técnica**. Belo Horizonte, 1994.

CHAVES, M. M. F.; RAMALHO, R. S. Estudos morfológicos em sementes, plântulas e mudas de duas espécies arbóreas pioneiras da família Asteraceae (*Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. e *Vernonia discolor* (Spreng-Kess). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 20, n. 1, p. 1-7, jan./mar. 1996.

CHET, I. Microbial control of plant diseases. In: MICHELL, R. (Ed.). **Environmental microbiology**. New York: Wiley-Liss, 1992. p. 335-354.

CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **American Naturalist**, Chicago, v. 160, p. S99-S127, 2002.

CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931. v. 1, p. 431-433.

DAI, J. et al. New naphthalene-chroman coupling products from the endophytic fungus, *Nodulisporium* sp. from Erica arborea. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, n. 10, p. 1564–1569, 2009.

DE SILVA, N.; PERERA, R. Mycology of nail disorders in Sri Lanka. In: ANNUAL ACADEMIC SESSIONS OF SRI LANKA MEDICAL ASSOCIATION, 1997, Colombo. **Proceedings...** Colombo: SLMA, 1997.

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 52, p. 455-463, 1999.

DING, T. et al. Disinfection efficacy and mechanism of slightly acidic electrolyzed water on *Staphylococcus aureus* in pure culture. **Food Control**, Vurrey, v. 60, p. 505-510, 2016.

FAETH, S. H.; FAGAN, W. F. Fungal endophytes: comon host plant symbionts but uncommon mutualist. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 42, p. 360-368, 2002.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implication of their occurrence. **Journal of Natural Products**, Circinnati, v. 69, p. 509–526, 2006.

HAINES, S. et al. Identification of novel components influencing colonization factor Antigen I Expression in Enterotoxigenic Escherichia coli. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, p. 141-469, 2015.

HANSEN, E. M.; REESER, P. W.; SUTTON, W. *Phytophthora* beyond agriculture. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 359–378, 2011.

HARAN, S. et al. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, p. 980-985, 1996.

HUSSAIN, H. et al. New bioactive 2, 3-epoxycyclohexenes and isocoumarins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus azorica*. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, v. 5, p. 749–756, 2009.

KHALDI, N. et al. SMURF: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 47, p. 736–741, 2010.

KONIG, G. M. et al. Geniculol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 62, p. 155-157, 1999.

LIMA, L. H. C.; DE MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 2, p. 263-304.

LINHARES, C. C. A sustentabilidade no manejo da candeia é investigada em pesquisa do IRI. **Agência Universitária de Notícias**, São Paulo, v. 44, n. 66, 2011. Disponível em: <<http://www.usp.br/aun/exibir.php?id=4101>>. Acesso em: 22 nov. 2015.

MITCHELL, A. M. et al. *Muscodor crispans*, a novel endophyte from *Ananas ananassoides* in the Bolivian Amazon. **Fungal Diversity**, Cham, v. 31, p. 37–43, 2008.

MUHAMMED, M. et al. *Fusarium* infection: report of 26 cases and review of 97 cases from the literature. **Medicine**, Baltimore, v. 92, p. 305–316, 2013.

MULLER, C. B.; KRAUSS, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 450-456, 2005.

PAL, K. K.; GARDENER, B. M. **Biological control of plant pathogens**. 2006. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Pages/BiologicalControl.aspx>>. Acesso em: 22 dez. 2015.

PASTOR-CORRALES M. A.; TU J. C. Anthracnose. In: SCHWARTZ, H. F.; PASTOR CORRALES, M. A. (Ed.). **Bean production problems in the tropics**. Cali: CIAT, 1989. p. 77–104.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microorganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 62-76, 2002.

POND, K. **Water recreation and disease infections: plausibility of associated acute effects, sequelae and mortality.** London: IWA, 2005.

RANAWAKA, R. R.; DE SILVA, N.; RAGUNATHAN, R. W. Nondermatophyte mold onychomycosis in Sri Lanka. **Dermatology Online Journal**, Davis, v. 18, p. 7, 2012.

SAIKKONEN, K. et al. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 29, p. 319-343, 1998.

SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. Symbiosis of grasses with seedbone fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 315-340, 2004.

SCOLFORO, J. R.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. **Manejo sustentado das candeias *Eremanthus erythropappus* Mc Leisch e *Eremanthus incanus* (Less.) Less.** 2004. Disponível em: <http://www.nucleoestudos.ufla.br/candeia/manual_simplificado.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2014.

SHWAB, E. K.; KELLER, N. P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes, **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 225-230, 2008.

SILVA, N. M. **Avaliação do potencial antimicrobiano, enzimático e crescimento de um isolado amazônico do fungo *Pycnoporus sanguineus*.** Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2010.

STROBEL, G. A. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 9, p. 240-244, 2006a.

STROBEL, G. A. *Muscodor albus* and its biological promise. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 33, p. 514-522, 2006b

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, p. 491–502, 2003.

STROBEL, G. A. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, Circinnati, v. 67, p. 257–268, 2004

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: BACON, C.W.; WHITE, J. F. **Microbial endophytes**. New York: M. Decker, 2000. p. 3-30.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, London, v. 18, p. 448–459, 2001

TEIXEIRA, M. C. B. et al. Influência da luz na germinação de sementes de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Shuh. Bip.). In: ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICA, 28., 1996, Belo Horizonte. **Anais ...** Belo Horizonte: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 1996. p. 35-41.

TOLEDO-SOUZA, E. D. et al. Interações entre *Fusarium solani* f. sp. phaseoli e *Rhizoctonia solani* na severidade da podridão radicular do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, p. 13–17, 2009.

VARMA, A.; SUDHA, S.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*: a cultivable plant growth promoting root endophyte with similarities to arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2741-2744, 1999.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. et al. *Listeria* Pathogenesis and molecular Virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 584–640, 2001.

VERMA, V. C.; KHARWAR, R. N.; STROBEL, G. A. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 4, p.1511–1532, 2009.

XING, Y. M. et al. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietman. **Current Microbiology**, New York, v. 62, p. 1218–1224, 2011.

WANG, Y. et al. Detection of resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* to carbendazim and dimethachlon in Jiangsu Province of China. Australas. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, p. 307-312, 2014.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, London, v. 23, p. 753–771, 2006.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1. ISOLATION, IDENTIFICATION AND ANTAGONISM OF ENDOPHYTIC FUNGI FROM *Eremanthus* sp.

Artigo redigido conforme as normas de revista científica (versão preliminar)

1. INTRODUCTION

The majority of living beings, especially plants, live in association with other microorganisms (FAETH; FAGAN, 2002). Those organisms can be filamentous fungi, bacteria and yeast, some of which can live inside (endophytic), or outside (epiphytic) of plants (SANTAMARÍA; BAYMAN, 2005).

Hosts plants of some endophytic fungi are more productive due resistance induced against pathogenic fungi, insects and nematodes, besides presenting considerable resistance to adverse climate conditions such as high temperature and dry weather. Moreover, endophytic fungi may produce alkaloids recently related to animal intoxication and they can attack nematodes and insects (VARMA et al., 1999; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; PAL; GARDENER, 2006).

Bioactive natural compounds of endophytic fungi, isolated from superior plants, are gaining considerable importance for pharmacological and agro-industrial products, environmental technology and bioconversion. These compounds can be found as secondary metabolites (STROBEL; DAISY, 2003; GUO et al., 2008), which present great importance to humanity due to their important antibiotic, pharmaceutical and immunosuppressive activities (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; DEMAIN, 1999).

Almost all of the plant species studied have an endophytic microbiota, but some plant species have been little studied, such as

Eremanthus sp. This superior tree belongs to the Asteraceae family and is extremely explored since its wood is used in fence posts and, in addition, alpha-bisabolol is extracted from it, an oil containing dermatological, spasmodic and anti-microbial properties (SCOLFORO et al., 2002, TEXEIRA et al., 1996), that makes it a potential source of fungi with the same properties. Thus, the objective of this work is to identify fungal genera present in *Eremanthus* sp. and evaluate the inhibition potential of these isolates against fungi in certain pathogenic bacteria and fungi.

2. MATERIAL AND METODS

The experiments were conducted in the Filamentous Fungi Genetics and Bioprospecting Laboratory – BIOGEN and Laboratory of Food Microbiology both from Federal University of Lavras - UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

2.1. Plant material

The samples of *Eremanthus* spp. were collected from three trees in each area, which were three areas: with humans living close by (Area 1), in their natural habitat (Area 2) and in planned planting (Area 3). Sampling was in the Serra da Mantiqueira, in the cities Aiuruoca (22°04'45.1"S and 044°39'03.8"W) and Bocaina de Minas (22°08'37.1"S and 044°27'12.3"W; 22°07'22.7"S and 044°27'51.3"W), and the tissues collected were taken to the (BIOGEN) of the Federal University of Lavras.

The collection was made from three trees from an area at breast height with the extraction of bark material 1 cm thick. The collected leaves should not present any symptom of disease or herbivory. The seeds were collected when they were still attached to the inflorescence. The samples were kept on ice until arrival in BIOGEN and immediately disinfested for endophytic isolation.

2.2. Endophytic fungi isolation

Leaves and bark were washed in sterile distilled water, 70% ethanol (1 min), sodium hypochlorite 2.5% (1 min) and sterile distilled water (3x), and then dried on filter paper and cut into smaller fragments (0.3 to 0.5 cm) totaling 135 fragments of each tissue. Five fragments were arranged on each plate containing PDA (Potato Dextrose Agar) medium plus 250 mg.L⁻¹ of cefotaxime and incubated at 26°C. Emerging fungal colonies from fragments were transferred to plates containing PDA/cefotaxime medium.

Seeds were placed in 50 mL Falcon tubes for disinfestation of epiphytic microorganisms. They were washed with autoclaved distilled water (1 min), 70% ethanol (2 min), sodium hypochlorite 5% (2 min) and autoclaved water three times (1 min); 0.1 mL of this last water was plated on PDA/cefotaxime for control verification. The seeds were dried on filter paper before being placed in petri dishes containing PDA/Cefotaxime medium. Five seeds were deposited in plates with three repetitions and incubated at 26°C. Plates were examined daily for the presence of colonies of fungi and bacterial contaminants. The grown endophytic fungi were transferred to individual plates containing PDA medium/Cefotaxime, incubated at 26°C and preserved by the Castellani method.

2.3. Molecular identification of isolated fungi

Molecular identification of isolated fungi was made by sequencing the ITS region from rDNA. For that, total DNA was extracted according to *Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA)* protocol. The DNA of each fungus was used for ITS amplification, which was conducted in 30 µL volumes containing 15 µL of Qiagen TopTaq Master Mix Kit 250 (containing 250U TopTaq DNA Polymerase in total, 10x CoralLoad

Concentrate, and RNase-free water), 10ng/3 μ L of total DNA, 10 pmol/2 μ L of each primer and 8 μ L of Milli-Q water. The primers used in the amplification are ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Amplifications were carried out in a thermocycler with initial step of 94°C for 2 minutes, then programming of 35 cycles of denaturation at 94°C for 30s, annealing at 58°C for 30 seconds, extension at 72°C for a minute and a final extension of 7 minutes at 72° C.

The amplification product was purified and sequenced by Macrogen in South Korea. The sequences were edited using the software Sequencher 5.4., The sequences were then analyzed in BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.4. Antibacterial activity of supernatant of isolated fungi

Endophytic fungi were grown in 100ml of PD (Potato dextrose) medium and 4ml of each fungal supernatant was stored in an eppendorf in a freezer.

The fungal supernatant was tested for antibacterial activity by the agar diffusion method described by NCCL (2003) with modifications. The bacteria provided by the Food Microbiology Laboratory were *Escherichia coli* ATCC 3540, *Staphylococcus aureus* ATCC 5674, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 and *Salmonella enterica* Enteritidis S64. The bacteria were grown at 37°C in 10 mL of TSB (Tryptone Soya Broth) overnight and transferred to 10ml of saline until reaching a turbidity of 0.5 McFarland standard solution with a concentration of 10^8 CFU/ml. Then, 0.2 mL of the cultures were inoculated on plates with TSA (Tryptone Soya Agar) medium. The paper disks with 5 μ l of the endophytic fungi supernatant were placed over medium seeded with bacterial cultures. The plates with bacteria were incubated at 37°C for 16 to 18 hours. After this period, the inhibition zone formations were observed. The negative control was 5 μ l PD

medium without supernatant and the positive control was 5µl of Chloramphenicol at concentration of 30 µg/mL in the disks.

2.5. Antifungal activity of endophytic fungi isolates

The endophytic and phytopathogenic fungi were cultivated in PDA medium, each in one plate, for 5 to 7 days at 25°C. After that, a small piece of mycelium from isolated endophytes was placed in one half of the Petri plate containing PDA and incubated for 4 days at 25°C. After this period, fragments of the phytopathogenic fungi were removed and inoculated at 6 cm from endophytic fungus. These were incubated at 25°C in BOD for 10 days with subsequent analysis of the pathogen growth. As a control, the plant pathogenic fungus was inoculated on a Petri dish containing PDA medium. All the experiments were made in duplicate.

Those endophytes that inhibited the growth of phytopathogenic fungi were inoculated on potato dextrose agar in bipartite petri dishes, to determine whether the inhibition would be from the volatile compound. Furthermore, the interactions observed between endophytic fungi and plant fungi pathogens were separated into three classes: (1) Competition for space and nutrients; (2) Mycoparasitism and (3) Antibiosis or inhibition zone formed.

The pathogenic fungi tested were *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum lindermuthianum* and *Phytophthora* sp., all from Mycological Collection of Lavras except *C. lindemuthianum*, donated by the Molecular Genetics Laboratory, both from the Federal University of Lavras.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Based on culture dependent technique, a total of 105 endophytic fungi were isolated from *Eremanthus* sp. including 60 from bark, 13 from leaves and 32 from seeds. However, two of them stopped growing after the first antagonist test, thus, only 103 were molecularly identified (Table 1).

Table 1. Molecular identification of endophytic fungi recovered from *Eremanthus* sp. based on ITS rDNA analysis and number of isolates by host tissue.

Molecular Identification	Query cover (%)	Ident (%)	Host tissue		
			Seeds	Leaves	Bark
<i>Acremonium</i> sp.	98	93	-	-	1
<i>Alternaria alternata</i>	100	100	3	2	1
<i>Anthostomella</i> sp.	95	98	-	1	-
<i>Camarosporium</i> spp.	98	96	-	-	14
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	99	100	7	-	1
<i>Coprinellus radians</i>	99	99	1	-	-
<i>Cryptosporiopsis</i> spp.	98	96	-	-	22
<i>Diaporthe</i> spp.	100	97	16	-	-
<i>Epicoccum nigrum</i>	98	97	1	-	1
<i>Muscodor</i> sp.	98	99	-	1	-
Not identified	-	-	2	-	4
<i>Paraconiothyrium</i> spp.	98	99	1	-	1
<i>Peniophora</i> spp.	99	97	1	-	1
<i>Periconia</i> spp.	98	98	-	1	1
Pleosporales	71	90	-	-	1
<i>Trametes villosa</i>	98	99	-	-	1
<i>Xylaria</i> spp.	98	99	-	7	8
Xylariaceae	82	99	-	1	-
Xylariaceae	97	83	-	-	1

Area 2 (natural habitat) showed the highest number of isolates with 67 endophytic fungi. In Areas 1 (human interaction) and 3 (planned planting) 25 and 13 isolates were found, respectively. This result was expected because we believe that major vegetation diversity implies increasing diversity in the endophytic microbial community, as well as increased incidence of endophyte infections from the arctic to the tropics (ARNOLD; LUTZONI, 2007). A curious fact is that in Areas 1 and 3 the tissue with the highest amount of endophytic fungi was the seed with 52% and 76.9% fungal isolates, respectively, while in Area 2 the bark had the highest isolation, with 80.6% endophytic fungi obtained.

Most of our endophytic fungal isolates were present in bark samples, isolates such as *Camarosporium* spp. and *Cryptosporiopsis* spp. that showed specificity for this plant tissue. It is known that the largest amount of secondary metabolites, for example alpha-bisabolol, is present in the stem (LBVH, 2016), which suggests that the community living in the stem is favored by the protective action of these metabolites (OTERO et al., 2002; SIEBER; DOWORTH, 1994). Moreover, endophytic fungi exhibit tissue specificity because of their adaptation to different physiological conditions in plants (RODRIGUES; SAMUELS, 1990).

Magalhães et al. (2008) also worked with *Eremanthus* sp. and reported the isolation of 159 endophytic fungi distributed in eight genera. However, our study identified fifteen genera, of which twelve were different: *Acremonium*, *Anthostomella*, *Camarosporium*, *Coprinellus*, *Cryptosporiopsis*, *Diaporthe*, *Epicoccum*, *Muscodor*, *Paraconiothyrium*, *Peniophora*, *Periconia* and *Trametes*. This fact can be explained by sampling carried out in different places, since we collected in the Mata Atlântica while they collected in the Cerrado, two totally different biomes. Thus, those twelve different genera are reported for the first time in *Eremanthus* sp.

Among the endophytic fungi found, some are described in the literature for presenting interesting biotechnological features. The genus *Xylaria* sp. is known to have secondary compounds that inhibit tumor cells and various microorganisms such as bacteria, protozoa, yeasts and filamentous fungi (HEALY et al., 2004; CHEN et al., 2011; JANG et al., 2007; TANSUWAN et al., 2007, JIMENEZ-ROMERO et al., 2008), in addition to possessing an anti-inflammatory effect (KO et al., 2011).

The genus *Muscodor*, also found in our study, is known as a producer of mixtures of volatile organic compounds, which inhibit growth of a wide variety of pathogenic fungi and bacteria, as well as some nematode and arthropod species (WORAPONG et al., 2001; STROBEL et al., 2001; MCAFEE; TAYLOR 1999; WORAPONG et al., 2002).

Two species and one genera belonging to the phylum Basidiomycota, *Coprinellus radians*, *Trametes villosa* and *Peniophora* spp. was recovered in our study. *T. villosa* and *Peniophora* spp. has been reported as producing important enzymes such as laccase (HUTTERMANN et al., 1989; NIKU-PAAVOLA et al., 2004). The production of the enzyme laccase by endophytic fungi is interesting because it is used in various industrial applications, including bioremediation, clarification of wine, ethanol production analysis and biosensors construction (YAROLOV et al., 1994; SIGOILLOT et al., 2004).

Moreover, other endophytic genera found are known as producers of compounds and enzymes important in the pharmaceutical and agronomic industry. Among them there is the *Acremonium* sp, a producer of cephalosporin C (HU et al., 2015); *Alternaria* sp, producer of mycotoxins in cereals and fruits (LOPEZ, et al., 2016); *Cladosporium* sp, which produces antimicrobial compounds (DING et al., 2008); *Coprinellus radians* that releases enzymes with peroxidase action (ARANDA et al., 2009); *Cryptosporiopsis* includes species that produce antibiotics and herbicides

(NOBLE 1991; SCHULZ, 1995, 2002); *Diaporthe* sp. produces antibiotic (BANDRE; SASEK, 1977, DETTRAKUL et al. 2003, LIN et al. 2005) and anticancer (KUMARAN; HUR, 2009) compounds; *Paraconiothyrium* sp. releases Brefeldin A with antifungal, antiviral and anticancer properties (KHAN et al, 2012) and *Periconia* sp. produces alkaloids (VERMA, 2011).

Furthermore, in tests that evaluate the potential inhibition of supernatants of endophytic fungi against pathogenic bacteria, our results showed no inhibition of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *S. Enteritidis*. Previous studies reported that extract of endophytic fungi belonging to genera identified in our study inhibited *E. coli*, *S. aureus* and *S. Enteritidis* (VIEIRA et al., 2012; XING et al., 2011; LI et al., 2015; SORRES et al., 2015; YUE et al., 2015; HU et al., 2015; KURZATKOWSKI; GEBSKA-KUCZEROWSKA, 2015). However, those endophytic fungi were not isolated from *Eremanthus* sp. Furthermore, in these studies extracts were used that may be present higher bioactive compound concentrations of than in our supernatant.

Endophytic fungi also were tested against five plant pathogens. Figure 1 shows the interaction classes observed between endophytic and phytopathogenic fungi. The antagonisms that show an inhibition halo were tested for volatile compounds production and exhibited negative results indicating that the inhibitory compounds are released into the culture medium.

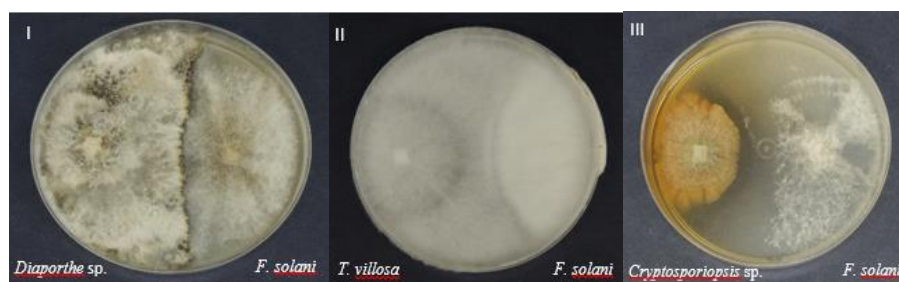


Figure 1. Endophytic fungi are on the left and the pathogenic fungi are on the right side. I) Class I – Competition; II) Class II – Mycoparasitism and III) Class III – Antibiosis, inhibition zone formed.

According to Pal and Gardener (2006), promising results for inhibiting pathogens in the field are mycoparasitism and antibiosis. Thus, despite Class I being the most frequent accounting for 72.24% of the results, it did not show inhibition of the pathogenic fungi, just competition for space and /or nutrients, representing no interesting results for biological control.

Fungi of the phylum Basidiomycota, such as *Trametes villosa*, are not commonly reported as endophytic and mycoparasitic at the same time. In Class II *T. villosa* did not overgrow only the colony of *Fusarium oxysporum*. Thus, a better study of *T. villosa* would be interesting in order to discover their biocontrol potential. In addition, studies with Basidiomycetes have increased considerably because of its ability to produce biotechnological compounds used in pharmacology and agriculture (DE SILVA et al., 2013).

Class III includes all antagonism tests that resulted in the inhibition halo, and the results are shown in Table 2.

Some of the endophytic genera found in *Eremanthus* sp. are not commonly reported in biological control, such as *Cryptosporiopsis*, which inhibited the growth of *F. solani*, *F. oxysporum*, *C. lindemuthianum*, *S. sclerotiorum* and *Phytophthora* sp. Some species have been found as pathogen and endophyte and can produce secondary metabolites with antibacterial, antifungal and herbicidal activity (NOBLE et al., 1991; SCHULZ et al., 1995, 2002; STROBEL et al., 1999). Among these metabolites, Strobel et al. (1999) described cryptocandin, which inhibits

Trichophyton spp., *S. sclerotiorum*, *Candida albicans* and *Histoplasma capsulatum*. Thus, fungi of this genus may be candidates for more detailed studies on biological control.

Table 2. Number of endophytic fungi that formed an inhibition zone with the respective pathogens.

Endophytic fungi	Pathogenic fungi				
	<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>C. lindemuthianum</i>	<i>Phytophthora</i> sp.
<i>Acremonium</i> sp.	-	-	-	1/1	-
<i>Alternaria</i> sp.	-	1/6	1/6	1/6	-
<i>Anthostomella</i> sp.	1/1	1/1	-	1/1	-
<i>Camarosporium</i> sp.	4/14	-	-	4/14	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	-	3/8	-
<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	16/22	19/22	1/22	15/22	1/22
<i>Diaporthe</i> sp.	-	-	3/16	7/16	1/16
<i>E. nigrum</i>	2/2	2/2	-	2/2	-
Not Identified	3/6	2/6	2/6	4/6	-
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	1/2	1/2	-	-	-
Pleosporales	1/1	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.	3/15	-	1/15	2/15	-

Moreover, in our study two strains of *E. nigrum* showed antimycotic activity against *F. solani*, *F. oxysporum* and *C. lindemuthianum*. In previous studies *E. nigrum* was reported as having efficient control of brown rot in peach and nectarine postharvest (LARENA et al., 2005; MARI et al., 2007), whereas *Diaporthe* sp. also presented inhibition of *S. sclerotiorum*, *C. lindemuthianum* and *Phytophthora* sp. Interestingly, *Diaporthe* is a teleomorph of *Phomopsis*, which was reported as a producer of enzymes and secondary metabolites (ELSAESSER et al. 2005; KOBAYASHI et al. 2003; ISAKA et al. 2001; DAI et al. 2005)., *Diaporthe* sp. was also reported as a producer of phytotoxic and mycoherbicide compounds (ANDOLFI et al., 2015).

In our study, the endophytic genus *Xylaria* sp. inhibit *F. solani*, *S. sclerotiorum* and *C. lindemuthianum*. Previous works with compounds produced by *Xylaria* species demonstrated that the secondary metabolites released by this fungus have significant antifungal activity against pathogens such as *F. solani*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Gibberella saubineti*, *Phytium ultimum*, *Magnaporthe grisea*, *Aspergillus niger*, *Alternaria panax*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Alternaria mali*, *A. porri*, *Rhizoctonia solani*, *Fulvia fulva* and *Cylindrocarpon destructans* (ZHANG et al. 2014; BARABAN et al. 2013; JANG et al., 2007). Such reports suggest that the compounds produced by the genus *Xylaria* should be further studied to optimize their biocontrol activity also demonstrated herein.

Some endophytes of *Eragrostis* sp. were identified as belonging to the genus *Alternaria*. Kumar et al. (2011) also found *Alternaria* species as endophytic from *Tylophora indicata*. They reported that *Alternaria tenuissima* and *Alternaria* sp. showed activity against both *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium oxysporum*, which corroborates our results, in addition to *C. lindemuthianum*.

To our knowledge, our study is one of the few reporting antifungal activity of some genera found in *Eragrostis* sp., such as *Camarosporium*, *Anthostomella*, *Acremonium* and *Paraconiothyrium*.

3. CONCLUSIONS

Considering the results obtained in this study, it was concluded that isolated genera of endophytic fungi have not been reported in *Eremanthus* spp. yet, such as *Acremonium*, *Anthostomella*, *Camarosporium*, *Coprinellus*, *Cryptosporiopsis*, *Diaporthe*, *Epicoccum*, *Paraconiothyrium* and *Trametes*. Some have been found in other plants and reported as producers of secondary metabolites and biocontrol agents.

Regarding antimicrobial potential, the fungal isolates did not inhibit the growth of the bacteria used. However, regarding the antifungal potential some fungi have excelled in antagonism against pathogens, including some genera not yet reported in *Eremanthus* sp.

In general, the endophytic fungi found in our work are able to produce substances that inhibit the growth of different pathogenic fungi. Among them, *Cryptosporiopsis* sp showed high inhibition capacity of the majority of the pathogens used. Furthermore, this work is the first to test whether the endophytic fungi present in *Eremanthus* sp. have antimicrobial activity.

4. REFERENCES

ANDOLFI, A., BOARI, A., EVIDENTE, M., CIMMINO, A., VURRO, M., ASH, G., EVIDENTE, A. Gulopyrones A and B and phomentrioloxins B and C produced by *Diaporthe gulyae*, a potential mycoherbicide for saffron thistle (*Carthamus lanatus*). **J Nat Prod**, 78: 623-629, 2015.

ARANDA, E., KINNE, M., KLUGE, M., ULLRICH, R., HOFRICHTER, M. Conversion of dibenzothiophene by the mushrooms *Agrocybe aegerita* and *Coprinellus radians* and their extracellular peroxygenases. **Appl Microbiol Biotechnol**, 82: 1057-1066, 2009.

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

BANDRE TR, SASEK V. Antibiotic activity of pyrenomycetes under submerged conditions. **Folia Microbiologica** 22: 269-274, 1977.

BARABAN, E.G., MORIN, J.B., PHILLIPS, G.M., PHULLIPS, A.J., STROBEL, S.A., HANDELSMAN, J. Xyloide, a bioactive nonenolide from an Amazonian endophytic fungus, *Xylaria feejeensis*. **Tetrahedron Letters**, 54:4058-4060, 2013.

BOTTCHER, U.F.; TRJANOWSKI, J.; HUTTERMANN, A. New form of lignolytically active mycelium generated by immobilization of protoplasts isolated from the white rot fungi *Heterobasidion annosum* and *Polyporus pinsitus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n.4, p.380-386, 1988.

CHEN, Z. et al. New cytochalasins from the marine-derived fungus *Xylaria* sp. SCSIO 156. **Helvetica Chimica Acta**, Vol. 94, 1671-1676, 2011.

CHOWDHARY K., KAUSHIK N. Fungal Endophyte Diversity and Bioactivity in the Indian Medicinal Plant *Ocimum sanctum* Linn. **PLoS ONE** 10(11): e0141444, 215. doi:10.1371/journal.pone.0141444

DAI J, KROHN K, FLOERKE U, GEHLE D, AUST HJ, DRAEGER S, SCHULZ B, RHEINHEIMER J. Novel highly substituted biraryl ethers, phomopsines D-G, isolated from endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. **Eur J Org Chem** 23:5100-5105, 2005.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Bioorg. **Med. Chem.** 2009, 17, 4022-4034.

- DE JONG, E. et al. Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidative activity. **Mycological Research**, v.95, n.12, p.1098-1104, 1992.
- DE SILVA, D.D., RAPIOR, S., SUDARMAN, E., STADLER, M., XU, J., ALIAS, S.A., HYDE, K.D. Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. **Fungal Diversity**, 62: 1-40, 2013.
- DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 52: 455-463. 1999.
- DETRAKUL S, KITTAKOOP P, ISAKA M, NOPICHAIS, SUYARNSESTAKORN C, TANTICHARONEN, M., THEBTARANONTH, Y. Antimycobacterial pimarane diterpenes from the fungus *Diaporthe* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 7: 1253–1255, 2003.
- DING, L., QIN, S., LI, F., CHI, X., LAATSCH, H. Isolation, Antimicrobial activity, and metabolites of fungus *Cladosporium* sp. associated with red alga *Porphyra yezoensis*. **Curr Microbial**, 56: 229-235, 2008.
- ELSAESSER B, KROHN K, FLOERKE U, ROOT N, AUST HJ, DRAEGER S, SCHULZ B, ANTUS S, KURTAN T. X ray structure determination absolute configuration and biological activity of phomoxanthone A. **Eur J Org Chem** 21:4563–4570, 2005.
- FAETH, S. H.; FAGAN, W. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. **Integrated and Composition Biology**, v. 42, p. 360-368, 2002.
- GAMBOA, M. A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter? **Mycopathologia**, v. 156, p. 41-45, 2002.
- GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 44, n.. 2, p. 136–142, 2008.
- HEALY, P.C. et al. Xanthenes from a microfungus of the genus *Xylaria*. **Phytochemistry**, 65, 2373-2378, 2004.
- HU, P., WANG, Y., ZHOU, J., PAN, Y., LIU, G. AcstuA, which encodes an APSES transcription regulator, is involved in conidiation, cephalosporin biosynthesis and cell wall integrity of *Acremonium chrysogenum*. **Fungal Genetics and Biology** 83: 26–40, 2015.

- HUTER, O.F. Use of natural products in the crop protection industry. **Phytochem. Rev.**10: 185–194, 2011.
- HUTTERMANN, A. et al. Enzymatic modification of lignin for technical use: strategies and results. **ACS symposium series**. Oxford Press, 1989.
- ISAKA M, JATURAPAT A, RUKSEREE K, DANWISETHANJANA K, TANTICHAROEN M, THEBTARANONTH Y. Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimmers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. **J Nat Prod** 64:1015–1018, 2001.
- JANG, Y-W., LEE, I-K., KIM, Y-S., LEE, S., LEE, H-J., YU, S.H., YUN, B-S. Xylarinic acids A and B, new antifungal polypropionates from the fruiting body of *Xylaria polymorpha*. **J. Antibiot.** 60(11): 696–699, 2007.
- JIMÉNEZ-ROMERO, C., ORTEGO-BARRÍA, E., ARNOLD, A.E., CUBILLA-RIOS, L. Activity against *Plasmodium falciparum* of lactones isolated from the endophytic fungus *Xylaria* sp. **Pharmaceutical Biology** Vol. 46, Nos. 10–11, pp. 700–703, 2008.
- KHAN, A.L.; HAMAYUN, M.; HUSSAIN, J.; KANG, S.; LEE, I. The newly isolated endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. LK1 produces ascotoxin. **Molecules**, 17:1103-12, 2012.
- KO, H-J., SONG, A., LAI, M-N., NG, L-T. Immunomodulatory properties of *Xylaria nigripes* in peritoneal macrophage cells of Balb/c mice. **Journal of Ethnopharmacology** 138, 762– 768, 2011.
- KO, K.S.; JUNG, H.S. Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera. **Antonie van Leeuwenhosk**, v. 75, n.3, p. 191-199, 1999.
- KOBAYASHI H, MEGURO S, YOSHIMOTO T, NAMIKOSHI M. Absolute structure, biosynthesis, and anti-microtubule activity of phomopsidin, isolated from a marine derived fungus *Phomopsis* sp. **Tetrahedron** 59:455–459, 2003.
- KUMAR, S., KAUSHIK, N., EDRADA-EBEL, R., EBEL, R., PROKSCH, P. Isolation, characterization, and bioactivity of endophytic fungi of *Tylophora indica*. **World J Microbiol Biotechnol**, 27:571-577, 2011.
- KUMARAN RS, HUR B. Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol. **Biotechnology and Applied Biochemistry** 54: 21–30, 2009.

KURZATKOWSKI, W., GEBSKA-KUCZEROWSKA, A.

Compartmentalization in cephalosporin c biosynthesis by industrial strains of *Acremonium chrysogenum*. **Post. Mikrobiol**, 54, 4, 374–379, 2015.

LABORATORIES LBVH. **Hevea l infini vegetal**. Disponível em:

<<http://www.labo-hevea.com/taripro/vanillosmopsis.htm>. Acesso em: 5 jan. 2016.

LARENA, I., TORRES, R., DE CAL, A., LIÑÁN, M., MELGAREJO, P., DOMENICHINI, P., BELLINI, A., MANDRIN, J.F., LICHOU, J., OCHOA DE ERIBE, X., USALL, J. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. **Biological Control**, 32:305-3010, 2005.

LI, G., KUSARI, S., KUSARI, P., KAYSER, O., SPITELLER, M.

Endophytic *Diaporthe* sp. LG23 produces a potent antibacterial tetracyclic triterpenoid. **J. Nat. Prod.**, 78, 2128–2132, 2015.

LIN X, HUANG Y, FANG M, WANG J, ZHENG Z, SU W. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* sp. **FEMS Microbiology Letters** 251: 53–58, 2005.

LÓPEZ, P., VENEMA, D., DE RIJK, T., DE KOK, A., SCHOLTEN, J.M., MOL, H.G.J., DE NIJS, M. Occurrence of *Alternaria* toxins in food products in The Netherlands. **Food Control**, 60: 196-204, 2016.

MAGALHÃES, W.C.S.; MISSAGIA, R.V.; COSTA, F.A.F.; COSTA, M.C.M. Diversidade de fungos endofíticos em Candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish. **Cerne, Lavras**, v. 14, n. 3, p. 267-273, jul./set. 2008.

MARI, M., TORRES, R., CASALINI, L., LAMARCA, N., MANDRIN, J.F., LICHOU, J., LARENA, I., DE CAL, M.A., MELGAREJO, P., USALL, J. Control of postharvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. **J. Sci. Food Agric.**, 87:1271-1277, 2007.

MCAFEE, B. J., TAYLOR, A. A review of the volatile metabolites of fungi found on wood substrates, **Nat. Toxins** 7 283–303, 1999.

NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition*. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). **NCCLS**, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, 17: 215-234. 2000.
- NIKU-PAAVOLA, M-L., FAGERSTROM, R., KRUUS, K., VIIKARI, L. Thermostable laccases produced by a white-rot fungus from *Peniophora* species. **Enzyme and Microbial Technology**, 35: 100-102, 2004.
- NOBLE, H. M., LANGLEY, D., SIDEBOTTOM, P. J., LANE, S. J. & FISHER, P. J. An echinocandin from an endophytic *Cryptosporiopsis* sp. and *Pezicula* sp. in *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. **Mycological Research** 95: 1439±1440, 1991.
- ORTIZ-MONSALVE, S. Estudos de descoloração de corantes para couro pelo isolado nativo *Trametes villosa* SC10. 2015. 171 p. **Dissertação (Mestrado)** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- OTERO, J. T. et al. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia-like* fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 11, p. 1852-1858, 2002.
- PAL, K. K., GARDENER, B.M. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor** DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02, 2006.
- PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Micro-organismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.
- RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. Preliminary study of endophytic fungi in tropical palm. **Mycological Research**, v.94, p. 827-830, 1990.
- SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**, 50, 1-8. 2005.
- SCHULZ, B., BOYLE, C., DRAEGER, S., ROMMERT, A-K., KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycol. Res.** 106 (9) : 996±1004, 2002.
- SCHULZ, B., SUCKER, J., AUST, H. J., KROHN, K., LUDEWIG, K., JONES, P. G., DORING, D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezicula* species. **Mycological Research** 99: 1007-1015, 1995.
- SCOLFORO, J. R.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C.; CAMOLISI, J. F. Manejo sustentado das candeias: *Eremanthus erythopappus* (DC.) McLeish

e *Eremanthus incanus* (Less.) Less. **Departamento de Ciências Florestais**, Universidade Federal de Lavras, 2002.

SIEBER, T. N.; DORWORTH, C. E. An ecological study about assemblages of endophyte fungi in *Acer macrophyllum* in British Columbia: in search of candidate mycoherbicides. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 72, 1994.

SIGOILLOT, C.; RECORD, E.; BELLE, V.; ROBERT, J. L.; LEVASSEUR, A.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; FOURNEL, A.; SIGOILLOT, J. C.; ASTHER, M.; **Appl. Microbiol Biotechnol**, 64, 346, 2004.

SORRES, J., NIRMA, C., TOURÉ, S., EPARVIER, V., STIEN, D. Two new isopimarane diterpenoids from the endophytic fungus *Xylaria* sp. SNB-GTC2501. **Tetrahedron Letters** 56: 4596–4598, 2015.

STROBEL, G. A., DIRKSIE, J., SEARS, J. AND MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from a novel endophytic fungus. **Microbiol**. 147:2943-2950, 2001.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G.A., MILLER, R.V., MARTINEZ-MILLER, C., CONDRON, M.M., TEFLOW, D.B., HESS, W.M. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Microbiology**, 145, 191 9-1 926, 1999.

STROBEL, G.A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

TANSUWAN, S., PORNPAAKAKUL, S., ROENDSUMRAN, S., PETSOM, A., MUANGSIH, N., SIHANONTA, P., CHAICHIT, N. Antimalarial benzoquinones from an endophytic fungus, *Xylaria* sp. **J. Nat. Prod.** 70, 1620–1623. 2007.

TEIXEIRA, M. C. B.; NUNES, Y. R. F.; MAIA, K. M. P.; RIBEIRO, R. N. Influência da luz na germinação de sementes de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip). In: ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICA,

28., 1996, Belo Horizonte. **Anais... Belo Horizonte: SBB**. Pontificia Universidade Católica de MG, 1996. p. 35-41.

VARMA, A.; SUDHA, S.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*: a cultivable plant growth promoting root endophyte with similarities to arbuscular mycorrhizal fungi. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, p. 2741-2744, 1999.

VERMA, V.C., LOBKOVSKY, E., GANGE A.C., SINGH, S.K., PRAKASH, S. Piperine production by endophytic fungus *Periconia* sp. isolated from *Piper longum* L. **The Journal of Antibiotics**, 64: 427-431, 2011.

VIEIRA, M.L.A., HUGHES, A.F.S., GIL, V.B., VAZ, A.B.M., ALVES, T.M.A., ZANI, C.L., ROSA, C.A., ROSA, L.H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). **NRC Research Press, Microbial** 58: 54-66, 2012.

WORAPONG, J., G. STROBEL, E. J. FORD, J. Y. LI, G. BAIRD & W. H. HESS. *Muscodor albus* anam. gen. et sp. nov. an endophyte from *Cinnamomum zeylandicum*. **Mycotaxon** 79: 67-79, 2001.

WORAPONG, J., STROBEL, G. A., DAISY, B., CASTILLO, U. F., BAIRD, G., HESS, W. M. *Muscodor roseus* anam. sp. nov., an endophyte from *Grevillea pteridifolia*, **Mycotaxon** 81 463-475, 2002.

XING, Y-M., CHEN, J., CUI, J-L., CHEN, X-M., GUO, S-X. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietman. **Curr Microbiol**, 62:1218-1224, 2011.

YAROLOV, A. I.; SKOROBOGATKO, O. V.; VARTANOV, S. S.; VARFOLOMEYER, S. D.; **Appl. Biochem. Biotechnol.** 49: 257, 1994.

YUE, Y., YU, H., LI, R., XING, R., LIU, S., LI, P. Exploring the antibacterial and antifungal potential of jellyfish-associated marine fungi by cultivation-dependent approaches. **PLoS ONE** 10(12):e0144394, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0144394

ZHANG, Q., XIAO, J., SUN, Q-Q., QIN, J-C., PESCIPELLI, G., GAO, J-M. Characterization of cytochalasins from the endophytic *Xylaria* sp. and their biological functions. **J Agric Food Chem**, 62:10962-10969, 2014.