



RAFAELA MERLO DOS ANJOS

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO
SAROCLADIUM EM GRAMÍNEAS**

**LAVRAS – MG
2017**

RAFAELA MERLO DOS ANJOS

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *SAROCLADIUM* EM
GRAMÍNEAS**

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.

Orientador

Prof. Dr. Eduardo Alves

Co-Orientadora

Prof(a). Dr(a). Patrícia Gomes Cardoso

**Lavras – MG
2017**

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

Anjos, Rafaela Merlo dos.

Diversidade de fungos endofíticos do gênero *Sarocladium* em
gramíneas / Rafaela Merlo dos Anjos. - 2017.

56 p.

Orientador(a): Eduardo Alves.

Coorientador(a): Patrícia Gomes Cardoso.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Fungos endofíticos. 2. *Sarocladium*. 3. Morfologia. I. Alves,
Eduardo . II. Cardoso, Patrícia Gomes. III. Título.

Aos meus pais, Ângelo e Dorotéia e ao meu irmão Pedro, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos dessa caminhada.

Ao meu marido, Renan, por acreditar em mim em mais uma etapa vencida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ângelo e Dorotéia, que dedicaram todo amor a mim e ao meu irmão, para que sempre tivéssemos e déssemos o melhor que temos, sempre apoiando e nos encorajando para nunca desistirmos de nossos sonhos.

Ao meu marido, Renan, que nunca deixou de acreditar em mim. Obrigada pelo incentivo companheirismo e amor, por estar comigo em todos os momentos e me completar com um amor sem limites.

Ao meu irmão, Pedro, que com seu companheirismo, brincadeiras e risadas deixava os dias mais leves e divertidos, quando as preocupações tomavam conta.

À minha avó, Luzia, que com suas orações e seu exemplo de fé abrandaram muitos momentos de angústia e que me fortaleciam para continuar em frente.

Aos meus tios, Lucas e Luiz (em memória), que cuidaram de mim e de meu irmão desde que nascemos sempre se dedicando e nos protegendo em todos os momentos.

A minha cunhada, Larissa, que é um exemplo de simplicidade e humildade. Obrigada pela ajuda no laboratório quando eu precisava ir aos fins de semana.

Às amigas e companheiras do mestrado, Marília, Dérica, Fernanda, Michelle, Rafaela Andrade, Silvia, Joice, Ana Paula, Daiane e à doutoranda Aline, pelas horas de estudos, pelas risadas dentro e fora de sala, por terem tornado os meus dias, nesses 2 anos, mais leves e divertidos.

À Silvino e Lucas, que se disponibilizaram a ajudar para que esse trabalho pudesse ser concluído.

Ao meu orientador, Eduardo e à minha co-orientadora, Patrícia, pelo apoio, por ter acreditado em mim. Pela chance da orientação que foram imprescindíveis para meu crescimento pessoal e profissional.

À Universidade Federal de Lavras e à CAPES, pela oportunidade de estudo e pela oportunidade de realização desse trabalho de mestrado.

A Maria Santíssima, que sempre me cobre com Seu manto, e intercedeu a Deus por mais uma etapa em minha vida. Que Sua presença seja sempre luz para meus passos em todos os dias de minha vida.

À Deus, que sempre abençoou meus passos, e colocou em minha vida pessoas iluminadas e que através delas cuidou de mim e me mostrou o caminho no qual eu deveria

trilhar. Obrigada pelas graças que sempre estão presentes em minha vida. Obrigada por mais essa graça.

Muito Obrigada!

“Deus não nos promete vida fácil.

Mas, se acreditarmos Nele, seremos vitoriosos!” (Pe. Gilson)

RESUMO

Fungos endofíticos são aqueles que habitam o interior de plantas e não causam danos aparentes a seus hospedeiros. Eles podem ser encontrados em folhas, caules e raízes. Durante investigações sobre fungos endofíticos de gramíneas tropicais, o gênero *Sarocladium*, pertencente ao filo *Ascomycota*, a ordem Hypocreales foi o predominante. O presente projeto visou avaliar a diversidade morfológica e filogenética de fungos endofíticos do gênero *Sarocladium* isolados das espécies de gramíneas *Brachiaria ruziziensis*, *B. brizantha*, *Panicum maximum*, *Penisetum purpureum* e *Cynodon nlemfuensis*. Para a caracterização morfológica, os isolados foram transferidos para os meios OA e BDA e incubados sob duas diferentes temperaturas, 25 ± 1 e 37 ± 1 °C, no escuro. O diâmetro das colônias, a coloração da frente e do verso, a textura do micélio, e a presença de exsudato foram examinados após 2, 6, 10 e 14 dias. As características micromorfológicas foram avaliadas ao 14º dia. A identificação das espécies foi realizada por filogenia molecular utilizando sequências parciais dos genes ACT, ITS e LSU. Foram identificadas cinco espécies filogenéticas de *Sarocladium*. *S. spinificis*, com setenta e três isolados identificados utilizando sequências de ITS, *S. terricola*, com cinco isolados identificados com sequências de ACT, *S. strictum*, com dois isolados identificados usando ACT e LSU, *S. bactrocephalum*, com três isolados identificados com ACT e LSU e uma provável nova espécie com oito isolados. Um isolado de *S. hominis* e um de *S. kiliense*, foram identificados utilizando sequências de ITS. Novas análises serão necessárias para definir se os isolados de *Sarocladium sp.* são espécies já conhecidas na literatura ou serão caracterizados como uma ou mais novas espécies de *Sarocladium*.

Palavras chaves: Fungos endofíticos. *Sarocladium*. Morfologia. Filogenia.

ABSTRACT

Endophytic fungi are those that inhabit the interior of plants and do not cause apparent damage to their hosts. They can be found in leaves, stems and roots. During investigations on endophytic fungi of tropic grasses, the genus *Sarocladium*, belonging to the phylum Ascomycota, the Hypocreales order was the predominant one. The present project aimed to evaluate the morphological and phylogenetic diversity of endophytic fungi of the genus *Sarocladium* isolated from the grass species *Brachiaria ruziziensis*, *B. brizantha*, *Panicum maximum*, *Penisetum purpureum* and *Cynodon nlemfuensis*. For morphological characterization, the isolates were transferred to the OA and BDA media and incubated under two different temperatures, 25 ± 1 and 37 ± 1 °C, in the dark. Colonial diameter, front and back staining, mycelial texture, and presence of exudate were examined after 2, 6, 10 and 14 days. Micro morphological characteristics were evaluated at day 14. Species identification was performed by molecular phylogeny using partial sequences of the ACT, ITS and LSU genes. Five phylogenetic species of *Sarocladium* were identified. *S. terricola*, with five isolates identified with ACT sequences, *S. strictum*, with two isolates identified using ACT and LSU, *S. bactrocephalum*, with three isolates identified with ACT and LSU and a probable new species with eight isolates. An isolate of *S. hominis* and one of *S. kiliense* were identified using ITS sequences. New analyzes will be needed to determine if the isolates of *Sarocladium* sp. Are species already known in the literature or will be characterized as one or more new species of *Sarocladium*.

Palavras chaves: Endophytic fungi. *Sarocladium*. Morphology. Phylogeny.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Árvore de Máxima Verossimilhança obtida a partir de análise com sequências de DNA do gene ITS. Clados formados têm suporte indicado pelo teste de bootstrap com 1000 pseudo replicatas. Isolados *Ex-type* estão em negrito e indicados pela letra T..... 29.
- Figura 2 - Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir de análise com sequências de DNA do gene LSU. Clados formados têm suporte indicado pelo teste de bootstrap com 1000 pseudo replicatas. Isolados *Ex-type* estão em negrito e indicados pela letra T..... 31.
- Figura 3 - Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir de análise de sequências de DNA do gene ACT. Clados formados têm suporte indicado pelo teste de bootstrap com 1000 pseudo replicatas. Isolados *Ex-type* estão em negrito e indicados pela letra T..... 33.
- Figura 4 – A – D Colônias de *Sarocladium spinificis* em meio BDA (A e B) e OA (C e D) após 14 dias de incubação a 25 °C, no escuro; E – J: Micrografias de microscopia de campo claro: E, F e G – Fiálides produzindo conídios em falsas cabeças; H – Hifas, Fiálides e conídios em falsas cabeças; I e J - Fiálides produzindo conídios em falsas cabeças e enrolamento de hifas; K – M Eletromicrografias de Varredura: K – Fiálides e enrolamento de hifas; L – Fiálide e hifas entrando e saindo do meio de cultivo; M – Conídios cilíndricos..... 38.
- Figura 5 – A – D Colônias de *Sarocladium terricola* em meio BDA (A e B) e OA (C e D) após 14 dias de incubação a 25 °C, no escuro; Micrografias de microscopia de campo claro: E e F – Fiálides produzindo conídios; G – Fiálides produzindo conídios em longas cadeias; H – Fiálides ramificadas. I – Conídios em longas cadeias; Fiálides e conídios em falsas cabeças; J – Hifas; K - Fiálides produzindo conídios em falsas cabeças; Eletromicrografias de Varredura: L – Fiálides produzindo conídeos; M e N – Conídios fusiformes e em longas cadeias..... 40.
- Figura 6 – A – D Colônias de *Sarocladium strictum* em meio BDA (A e B) e OA (C e D) após 14 dias de incubação a 25 °C, no escuro; Micrografias de microscopia de campo claro: E – Fiálides; F – Fiálides produzindo conídios em falsas cabeças; G – Hifas, fiálides e conídios; H, I e J – Hifas, fiálides e conídios em falsas cabeças e enrolamento de hifas; K – Hifas, fiálides e conídios; Eletromicrografias de Varredura: L e M – Fiálide e hifas; N e O – Conídios cilíndricos..... 42.
- Figura 7 – A – D Colônias de *Sarocladium bactrocephalum* em meio BDA (A e B) e OA (C e D) após 14 dias de incubação a 25 °C; Micrografias de microscopia de campo claro: E - J – Fiálides produzindo conídios em falsas cabeças; K – Hifas, Fiálides e conídios; Eletromicrografias de Varredura: L - Fiálides

produzindo conídios em falsas cabeças; M – Fiálides; N – Fiálide e conídios;
O – Conídios cilíndricos..... 44.

Figura 8 – Isolados de *Sarocladium* não identificados em nível de espécie. A – D –
Colônias em meio BDA (A e B) e OA (C e D) após 14 dias de incubação a 25
°C, no escuro; Micrografias de microscopia de campo claro: E – Fiálides e
conídios; F - J – Fiálides produzindo conídios em falsas cabeças; K –
Fiálides; Eletromicrografias de Varredura: L - Fiálides e conídios; M e N –
Conídios cilíndricos..... 46.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Código, hospedeiros e origem dos isolados de <i>Sarocladium</i> spp. utilizados.	17.
Tabela 2 – Sequências de ITS, LSU e ACT de isolados de <i>Sarocladium</i> spp. utilizadas como referência nos estudos filogenéticos.....	21.
Tabela 3 - Caracterização de isolados de <i>Sarocladium</i> cultivados em meios BDA (macromorfologia e temperatura de crescimento) e OA (micromorfologia) após 14 dias.....	36.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Fungos endofíticos em gramíneas	12
2.2 O gênero <i>Sarocladium</i>	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Obtenção e reativação dos isolados	17
3.2 Análises filogenéticas	17
3.3 Morfologia	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Análises Filogenéticas	26
4.2 Morfologia	35
4.2.1 <i>Sarocladium spinificis</i>	37
4.2.2 <i>Sarocladium terricola</i>	39
4.2.3 <i>Sarocladium strictum</i>	41
4.2.4 <i>Sarocladium bactrocephalum</i>	43
4.2.5 <i>Sarocladium</i> sp.	45
5 CONCLUSÃO	47

1 INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são aqueles que habitam o interior de plantas e não causam danos aparentes aos seus hospedeiros. Eles podem ser encontrados em folhas, caules e raízes. A relação entre endofíticos e hospedeiros é considerada uma relação mutualística onde o vegetal fornece alimento ao endofítico e o endofítico confere algum benefício ao vegetal. Estes podem também defender as plantas do ataque de patógenos. Os microrganismos endofíticos tem sido muito utilizados na agricultura e na indústria; várias espécies selecionadas de endofíticos apresentam potencial de emprego nas indústrias de defensivos agrícolas, além de serem utilizadas como vetores genéticos.

Dentre os fungos endofíticos podemos encontrar o gênero *Sarocladium*, pertencente ao filo *Ascomycota*, a ordem *Hypocreales* e é constituído de várias espécies importantes. Como exemplo pode-se citar *S. oryzae*, importante patógeno de plantas de arroz, *S. kiliense* que pode causar doenças em humanos, *S. strictum*, capaz de causar doença em plantas de sorgo e morango e *S. zae* que é encontrada como endofítica em milho e o protege contra herbivoria. A maioria das espécies de *Sarocladium* foram isoladas de espécies da família *Poaceae* e, estão associadas a elas como saprófitas, parasitas ou como endofíticos.

Muitos isolados do gênero *Sarocladium* são encontrados em plantas da família *Poaceae*, porém muito pouco é conhecido sobre as espécies *Sarocladium* endofíticos que compõe as populações destas importantes gramíneas forrageiras. A diversidade e a distribuição de espécies de endofíticos influencia a dinâmica e a adaptação de gramíneas a mudanças no meio ambiente, e este levantamento pode ser relevante no entendimento das relações ecológicas entre plantas e microorganismos e contribuir para a identificação de isolados com potencial para o desenvolvimento de inoculantes promotores de crescimento e/ou agentes de biocontrole.

Com isso, este trabalho visa avaliar a diversidade morfológica e filogenética de fungos endofíticos do gênero *Sarocladium* isolados das espécies de gramíneas *Brachiaria ruziziensis*, *B. brizantha*, *Panicum maximum*, *Penisetum purpureum* e *Cynodon nlemfuensis*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos endofíticos em gramíneas

Para garantir a sobrevivência, muitos seres vivos procuram condições de vida mais favoráveis, como grande quantidade de nutrientes, proteção contra outras espécies e abrigo, se adaptando ao ambiente realizando a simbiose. Um exemplo comum de simbiose é a relação entre plantas e fungos (KOGEL; FRANKEN; HUCKELHOVEN, 2006).

Uma associação muito comum é a mutualística, onde a convivência entre fungo e planta é benéfica a ambos, uma vez que os dois organismos sobrevivem assintomaticamente à associação. Por exemplo, o fungo recebe nutrição e abrigo da planta hospedeira e a planta aumenta sua capacidade de resistência a fatores bióticos e abióticos (CLAY; SCHARDL, 2002; SAIKKONEN et al., 1998; SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004).

O termo fungo endofítico tem sido utilizado desde o século XIX (AZEVEDO 1999; GIMENEZ et al., 2007). O conceito mais comumente utilizado para descrever fungos endofíticos é o proposto por Petrini (1991), definindo-os como habitantes do tecido vegetal em algum período de seu ciclo de vida, colonizando seu tecido interno sem causar danos ao hospedeiro. Supõe-se que as diversas interações entre as plantas e seus endofíticos foram aprimoradas e estabelecidas ao longo do tempo, fazendo com que surgissem especificidades em tal relação (TAN; ZOU, 2001; STROBEL, 2003). Isso os diferencia dos microrganismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas e causam-lhes doenças. Eles são também distintos dos microrganismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais (AZEVEDO, 1998; SOUZA et al., 2004).

Fungos endofíticos estão presentes em diferentes espécies vegetais como árvores (ARNOLD et al., 2003; ARNOLD; LUTZONI, 2007), palmáceas (FROEHLICH; HYDE; PETRINI, 2000), gramíneas (MULLER; KRAUSS, 2005) e líquens (LI et al., 2007). Eles habitam folhas, estruturas reprodutivas, pecíolos, cascas, galhos e também raízes (FAETH; FAGAN, 2002; RODRIGUEZ et al., 2009).

Os microrganismos endofíticos tem sido muito utilizados na agricultura e na indústria; várias espécies selecionadas de endofíticos apresentam potencial de emprego nas indústrias de defensivos agrícolas, além de serem utilizadas como vetores genéticos (VERZIGNASSI; HOMECHIN; VIDA, 1996; SOUZA et al., 2004).

O interesse na aplicação de microrganismos em práticas agrícolas aumentou significativamente nos últimos anos, já que promovem o crescimento vegetal e auxiliam no

controle biológico de pragas e doenças de plantas entre outras aplicações, e se constituem em potenciais substitutos de produtos químicos, podendo favorecer desta maneira a preservação do ambiente (SOUZA, 2001; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Em 1981, Webber foi talvez o primeiro pesquisador a relatar um exemplo de proteção vegetal por fungo endofítico, demonstrando que o endofítico *Phomopsis oblonga* protegia plantas de olmeiro contra besouros da espécie *Physocnemum brevilineum*. Essa proteção evitava a transmissão de fitopatógenos, pois o inseto atuava como vetor do fungo *Ceracystisulmi* que causa doença em olmeiro.

Sabe-se que são comercializadas diversas cultivares de gramíneas infectadas por *Epichloë* e *Neotyphodium* endofíticos. Isso mostrou que Cultivares infectadas com *Neotyphodium* e *Epichloë* promovem um aumento na resistência aos herbívoros, agentes patogênicos de plantas, e algumas condições de estresse abiótico. O uso de tais cultivares pode resultar em uma redução na utilização de inseticidas e fungicidas (BRILMAN, 2005).

Rodrigues e Dias-Filho, 1996 realizaram um estudo sobre fungos endofíticos em duas espécies de *Brachiaria* em pastagens no estado do Pará, e isolaram várias espécies endofíticas de folhas de *B. brizantha* cv. Marandu e *B. humidicola*, sendo elas *Acremonium* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Stagnospora* sp., *Trichoderma viride*, *Curvularia* cf. *pallescens*, *Leptosphaeria* sp., *Phomopsis* sp. e *Physalospora* sp.

A espécie *Acremonium zeae* foi encontrada como endofítica em grãos de milho e apresentou atividade antifúngica contra os patógenos *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*, ambos causadores do apodrecimento dos grãos (WICKLOW et al., 2005; WICKLOW e POLING, 2009).

2.2 O gênero *Sarocladium*

O gênero *Sarocladium* pertence a ordem Hypocreales, e foi descrito por Gams e Hawksworth em 1975. É caracterizado por apresentar fiálides cilíndricas com região apical mais afilada e produção de conídios hialinos (GAMS; HAWKSWORTH, 1975). O gênero *Sarocladium* possui várias espécies que apresentam as características acima citadas, incluindo *Sarocladium kiliense*, *Sarocladium oryzae* e *Sarocladium strictum*, que formam fiálides proeminentes, o que não é observado para *Acremonium*. *Sarocladium* abrange muitas espécies importantes. Como exemplo, isolados de *S. oryzae* produzem antibióticos, *S. kiliense* pode causar doenças humanas, *S. strictum* é capaz de causar doença em plantas de sorgo e morango, e *Sarocladium zeae* é considerada mutualista endofítica de milho e o protege contra

herbivoria (TSCHEN et al., 1997; BILLS; PLATAS; GAMS, 2004; SUMMERBELL et al., 2011; RACEDO et al., 2013).

Sarocladium oryzae é a espécie tipo do gênero, é um importante patógeno da podridão da bainha do arroz (AYYADURAI et al., 2005). Tal doença era considerada um problema de baixa extensão, porém tornou-se um grande problema para a produção de arroz, principalmente sob condições de estresse hídrico, podendo causar perdas de 3 a 85 % (GNANAMANICKAM; MEW, 1991; AMIN; SHARMA; DAS, 1974; CHAKRAVARTY; BISWAY, 1978). Os sintomas são caracterizados por lesões marrom-acinzentadas na folha que envolve a panícula, reduzindo a viabilidade da semente e seu valor nutricional. *S. oryzae* é disseminado verticalmente, por meio de sementes, mas pode sobreviver na forma micelial em restos vegetais infectados e no solo, através dos conídios, e em ervas daninhas hospedeiras. Pode infectar a planta de arroz penetrando via estômatos e ferimentos e sua presença pode estar associada a danos causados por insetos e ácaros. O dano é mais destrutivo se ocorrer no início da emergência da panícula (CHAKRAVARTY; BISWAY, 1978; CHEN; LINE; LEUNG, 1993; CHIEN; HUANG, 1979).

A espécie produz metabólitos secundários antimicrobianos tais como ácido helvólico e cerulenina (TSCHEN et al., 1997; GHOSH et al., 2002; BILLS; PLATAS; GAMS, 2004). Em experimentos feitos por Gnanamanickam e Mew (1991), verificou-se que essa espécie apresenta poder inibitório se colocada junto a outros patógenos de arroz, como *Sclerotium oryzae*, *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* e *Pyricularia oryzae*, sendo que as duas primeiras espécies foram mais sensíveis apresentando zonas de inibição de 27-32 mm em *S. oryzae* e 35-40 mm em *G. graminis* var. *graminis*.

As colônias de *S. oryzae* possuem crescimento lento em meio BDA (Batata Dextrose Agar), seu micélio aéreo é escasso e de cor laranja claro com reverso alaranjado geralmente mais escuro. Em meio Aveia Ágar as colônias são de esbranquiçadas a rosa claro. A consistência da colônia varia de acordo com o isolado, mas geralmente é algodonosa (BOA; BRADY, 1987). As hifas são septadas e ramificadas podendo medir até 2,5µm de espessura, algumas são retorcidas, mas hifas alongadas também podem ocorrer. Os conidióforos são abundantes e irregularmente ramificados. As células conidiogênicas podem se desenvolver isoladamente em hifas vegetativas ou em conidióforos delgados em forma fascicular. Os conídios são hialinos e formam-se como uma massa viscosa na ponta das fiáides, são subcilíndricos e ocasionalmente curvos (BRADY, 1980; BRIDGE et al, 1989).

Sarocladium attenuatum e *Sarocladium sinense* também são patógenos de arroz (GAMS; HAWKSWORTH, 1975; CHEN; ZHANG; FU, 1986) e o primeiro foi considerado sinônimo de *S. oryzae* (BILLS; PLATAS; GAMS, 2004). *Sarocladium attenuatum* se diferencia de *S. oryzae* por apresentar conidióforos verticilados e conídios longos e pontiagudos. Bridge et al. (1989) revisaram o conceito desta espécie e concluíram que a variação entre o tamanho e a forma dos conídios entre as duas espécies eram contínuos, passando *S. attenuatum* a ser considerada um sinônimo de *S. oryzae*. Isso foi consolidado por uma variedade de testes utilizando diferentes enzimas e substratos. Bridge et al., (1989) incluíram em seus estudos uma série de isolados descritos como *S. oryzae* isolados a partir de bambu em Bangladesh. Os isolados foram considerados consensuais, porém foi observado que isolados de bambu diferiam de isolados de arroz em algumas propriedades fisiológicas e bioquímicas. (SREENIVASAPRASAD; JHOSON, 2013; BOA; BRADY, 1987). Porém, Giraldo et al., (2015) concluíram em seus estudos que *S. oryzae* e *S. attenuatum* não possuem diferenças genéticas significativas para serem consideradas duas espécies diferentes e os consideraram a mesma espécie.

Summerbell et al., (2011) realizaram estudos filogenéticos de isolados de fungos *Acremonium*-like utilizando sequências de DNA da subunidade maior do DNA ribossômico, onde sete espécies antes alocadas no gênero *Acremonium* foram incluídas ao gênero *Sarocladium*. Dentre estas, espécies clinicamente importantes, como *Acremonium kiliense* e *Acremonium strictum*, e o endófito de plantas de milho, *Acremonium zaeae*, sendo renomeadas como *Sarocladium kiliense*, *Sarocladium strictum* e *Sarocladium zaeae*, respectivamente. Outras espécies de *Acremonium* reclassificadas como *Sarocladium* por Summerbell et al. (2011) foram *Sarocladium bacillisporum*, *Sarocladium bactrocephalum*, *Sarocladium glaucum* e *S. ochraceum*. *Sarocladium spinificis* é uma espécie endofítica de *Spinifex littoreus*, isolada na costa de Taiwan (YEH; KIRSCHNER, 2014).

A maioria das estirpes estudadas foram isoladas de espécies de planta da família *Poaceae*, como bambu, arroz, milho, outros cereais e gramíneas selvagens (GAMS, 1971; GAMS; HAWKSWORTH, 1975; SUMMERBELL et al., 2011). Espécies de *Sarocladium* são frequentemente associadas a gramíneas seja saprofitamente, como parasitas, ou como endofíticos (GAMS; HAWKSWORTH, 1975; SUMMERBELL et al., 2011).

Em um trabalho sobre gramíneas tropicais, Kelemu et al. (2001) reportaram a presença do endofítico *Sarocladium implicatum* em *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria arrecta*, o qual favoreceu a expansão de folhas e a produção de biomassa

significativamente em relação a plantas sem o fungo. Além disso, houve a redução dos sintomas de helmintosporiose e na esporulação do agente causal *Drechslera* sp. em folhas de *B. brizantha* (KELEMU et al., 2001).

A espécie *S. kiliense* é causadora de micetoma, queratite e onicomicose em humanos, doenças que possuem um difícil tratamento e muitas vezes têm um desfecho fatal (GUARRO et al., 1997; KHAN et al., 2011). Os fármacos antifúngicos utilizados para o tratamento das doenças causadas por essa espécie apresentam uma elevada concentração inibitória mínima, porém a espécie é resistente à esses fármacos dificultando a otimização de tratamentos (KHAN et al., 2011). Os antifúngicos mais utilizados nos tratamentos são a Anfotericina B (AMB), e em menor grau, o Voriconazol (VRC). No entanto, existem falhas terapêuticas principalmente em casos de fungemia e infecções disseminadas por humanos (BEAUDREUIL et al., 2003; GUARRO et al., 2009; HITOTO et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e reativação dos isolados

Fungos endofíticos foram isolados das gramíneas *Panicum maximum*, *Penissetum purpureum*, *Brachiaria ruziziensis*, *B. brizantha* e *Cynodon nlemfuensis*, provenientes de diferentes regiões do Brasil (Campo Grande – MS, Juiz de Fora – MG e Lavras – MG), obtidos durante trabalhos de Gama (2014) e Maia (2015). Fragmentos de colônias de 3–4 mm de diâmetro de fungos cultivados em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA, Batata, 200g; Dextrose, 20g; Ágar, 15g; adição de água destilada para volume final de 1000 ml) foram armazenados de acordo com o método de Castellani, em micro tubos esterilizados contendo água destilada esterilizada, mantidos a 4 °C (CASTELLANI, 1967).

3.2 Análises filogenéticas

Os isolados de *Sarocladium* (Tabela 1) foram reativados em BDA e incubados a 25 °C por 7 a 10 dias no escuro.

Tabela 1 – Código, hospedeiros e origem dos isolados de *Sarocladium* spp. utilizados.

Isolado	Hospedeiro	Origem	Identificação
Cyn01	<i>Cynodon nlemfuensis</i>	Juiz de Fora – MG	<i>S. spinificis</i>
Cyn02	<i>Cynodon nlemfuensis</i>		<i>S. spinificis</i>
Cyn03	<i>Cynodon nlemfuensis</i>		<i>S. spinificis</i>
Cyn04	<i>Cynodon nlemfuensis</i>		<i>S. spinificis</i>
Cyn05	<i>Cynodon nlemfuensis</i>		<i>S. spinificis</i>
Cyn06	<i>Cynodon nlemfuensis</i>		<i>S. spinificis</i>
Cyn07	<i>Cynodon nlemfuensis</i>		<i>S. spinificis</i>
Cyn08	<i>Cynodon nlemfuensis</i>		<i>S. spinificis</i>
Cyn09	<i>Cynodon nlemfuensis</i>		<i>S. spinificis</i>
Cyn10	<i>Cynodon nlemfuensis</i>		<i>S. spinificis</i>
Bra02	<i>Brachiaria</i>		<i>Sarocladium</i> sp.

	<i>brizantha</i> cv. Marandu		
Bra03	<i>Brachiaria</i> <i>brizantha</i> cv. Marandu		
Bra38	<i>Brachiaria</i> <i>ruziziensis</i>		<i>S. spinificis</i>
Bra40	<i>Brachiaria</i> <i>ruziziensis</i>		<i>S.</i> <i>bactrocephalum</i>
Bra43	<i>Brachiaria</i> <i>ruziziensis</i>		<i>Sarocladium</i> spp.
Bra44	<i>Brachiaria</i> <i>ruziziensis</i>		<i>S. strictum</i>
Pan07	<i>Panicum maximum</i>		<i>Sarocladium</i> sp.
Pan13	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. spinificis</i>
Pan21	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. spinificis</i>
Pan40	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. spinificis</i>
Pan46	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. spinificis</i>
Pan47	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. spinificis</i>
Pen02	<i>Pennisetum</i> <i>purpureum</i>		<i>Sarocladium</i> sp.
Pen03	<i>Pennisetum</i> <i>purpureum</i>		<i>Sarocladium</i> spp.
Pen04	<i>Pennisetum</i> <i>purpureum</i>		<i>Sarocladium</i> sp.
Bra04	<i>Brachiaria</i> <i>brizantha</i> cv. Marandu	Campo Grande – MS	<i>Sarocladium</i> spp.
Bra06	<i>Brachiaria</i> <i>brizantha</i> cv. Piatã		<i>Sarocladium</i> spp.
Pan49	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. spinificis</i>
Pan50	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. spinificis</i>
Pan51	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. spinificis</i>
Pan52	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. spinificis</i>
Pan53	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. spinificis</i>
Pan54	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. hominis</i>
Pan55	<i>Panicum maximum</i>		<i>Sarocladium</i> sp.
Pan56	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. spinificis</i>
Pan57	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. spinificis</i>
Pan58	<i>Panicum maximum</i>		<i>Sarocladium</i> sp.
Pan59	<i>Panicum maximum</i>		<i>Sarocladium</i> sp.
Pan62	<i>Panicum maximum</i>		<i>S.</i> <i>bactrocephalum</i>
Pan64	<i>Panicum maximum</i>		<i>Sarocladium</i> sp.
Pan65	<i>Panicum maximum</i>		<i>Sarocladium</i> sp.
Bra01	<i>Brachiaria</i> <i>brizantha</i> cv. Marandu	Lavras - MG	<i>S. strictum</i>
Pan01	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. spinificis</i>
Pan02	<i>Panicum maximum</i>		<i>S. spinificis</i>

Pan03	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan04	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan05	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan06	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan08	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan09	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan10	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan11	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan12	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan13	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan16	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan17	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan18	<i>Panicum maximum</i>	<i>Sarocladium</i> spp.
Pan19	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan20	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan22	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan23	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan24	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan25	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan26	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan27	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan28	<i>Panicum maximum</i>	<i>S.</i> <i>bactrocephalum</i>
Pan29	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan30	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan31	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan32	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan33	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan34	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan35	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan36	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan37	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan38	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan39	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan41	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan42	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan43	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan44	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan48	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan60	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan61	<i>Panicum maximum</i>	<i>S. spinificis</i>
Pan63	<i>Panicum maximum</i>	<i>Sarocladium sp.</i>

*Código dos Isolados: Cyn = *Cynodon nlemfuensis*; Bra = *Brachiaria brizantha* ou *B. ruziziensis*; Pen = *Pennisetum purpureum*; Pan = *Panicum maximum*.

Inicialmente realizou-se a extração do DNA total dos isolados obtidos utilizando o kit Qiagen® DNeasy® Plant Mini Kit (250) segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. A amplificação da região ITS foi feita utilizando os *primers* ITS 1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TTA TTG ATA TGC-3'), nas condições: 2 minutos a 95°C, 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C, 1 minuto a 72°C e 7 minutos a 72°C, programado para 35 ciclos (WHITE et al., 1990). As amplificações foram realizadas no termociclador Programmable Thermal Controller-100 MJ Research, Inc. Os produtos das amplificações foram enviados para a Macrogen® (Maryland, EUA) para sequenciamento. Assim, com as sequências geradas foi realizada uma triagem de isolados de *Sarocladium* utilizando o algoritmo BLAST® para consulta ao banco de dados do GenBank (NCBI). Após, realizou-se análise filogenética com o alinhamento de sequências de ITS disponíveis no GenBank (Tabela 2).

As sequências consenso foram obtidas a partir da edição dos eletroferogramas oriundos das reações com os primers 'sentido' e 'anti-sentido' da região sequenciada, para cada isolado. A edição de sequências e todas as outras etapas da análise filogenética foram conduzidas no programa Mega 6 (TAMURA et al. 2016). Sequências de referência de espécies de *Sarocladium* atualmente aceitas (GIRALDO et al. 2015, YEH et al. 2014) foram obtidas a partir do GenBank e usadas para compor alinhamentos múltiplos referentes à região ITS. As sequências foram alinhadas através do programa Muscle, implementado no Mega 6. Os alinhamentos foram submetidos a análises filogenéticas pelo método de Neighbor Joining (NJ). O método Maximum Composite Likelihood foi usado para inferir as distâncias filogenéticas entre os táxons e a variação entre os sítios das sequências foi modelada por uma distribuição gama. O suporte dos clados formados foi avaliado através de 1000 pseudo replicatas do teste de bootstrap.

Com auxílio da primeira análise feita com sequências de ITS, foram selecionados 20 isolados de *Sarocladium* para novas análises filogenéticas e caracterização fenotípica. Assim, sequências de DNA dos genes Actina (ACT) (HIROOKA et al., 2010) e Subunidade maior ribossomal (LSU) (GIRALDO et al., 2015) foram obtidas. O cultivo dos fungos e a extração de DNA total foi realizada como descrito acima.

Os *primers* utilizados para amplificação do gene ACT foram Tact1f (5'- TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GA -3') e Tact2r (5'- TCT CCT TCT GCA TAC GGT CGG A -3'), nas condições: 2 minutos a 95°C, 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C e 10 minutos a 72°C, programado para 30 ciclos (HIROOKA et al., 2010). Os *primers* utilizados

para amplificação do gene LSU foram: NL1 (5' - GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AA -3') e NL4b (5'- GGT CCG TGT TTC AAG ACG -3'), nas condições: 2 minutos a 95°C, 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 2 minutos a 72°C e 5 minutos a 72°C, programados para 30 ciclos (GIRALDO et al., 2015). Os produtos das amplificações foram enviados para a MacroGen® (Maryland, EUA) para sequenciamento. Após, realizou-se análises filogenéticas com o alinhamento de sequências de ACT e de LSU disponíveis no GenBank (Tabela 2). A obtenção de sequências consenso, edição, alinhamentos e análises filogenéticas foram feitos conforme descrito acima.

Tabela 2 – Sequências de ITS, LSU e ACT de isolados de *Sarocladium* spp. utilizadas como referência nos estudos filogenéticos.

Isolados	Código (s)	Origem	GenBank Accession Number		
			ITS	LSU	ACT
<i>S. bacillisporum</i>	CBS 119.79	Fatias de carne defumada, Suécia	HG965001	HG965050	HG964951
	CBS 425.67 T	Solo, Ontário, Canadá	HE608639	HE608658	HE608633
	CBS 787.69	Teleutosorus de <i>Puccinia graminis em Lolium temulentum</i> , Itália	HG965005	HG965054	HG964955
	CBS 212.79	Inseto, Romênia	HG965002	HG965051	HG964952
	CBS 485.67	Desconhecido	HG965004	HG965053	HG964954
	CBS 388.67	Solo, Holanda	HG965003	HG965052	HG964953
<i>S. bactrocephalum</i>	UTHSC 09-384	Olhos, EUA	HG965007	HG965055	HG964957
	CBS 749.69 T	<i>Ustilago</i> sp., Canadá	HG965006	HQ231994	HG964956
<i>S. bifurcatum</i>	UTHSC 05-3311 T	Fluido de lavagem bronco alveolar, EUA	HG965009	HG965057	HG964959

	UTHSC 07-3446	Fluido de lavagem brônquica, EUA	HG965010	HG965058	HG964960
	CBS 383.73	Caule de Bambu morto, Índia	HG965008	HG965056	HG964958
<i>S. gamsii</i>	CBS 425.73	Pecíolo morto de <i>Pandanus lerum</i> , Sri Lanka	HG965014	HG965062	HG964964
	CBS 707.73 T	Haste morta de <i>Pandanus lerum</i> , Sri Lanka	HG965015	HG965063	HG964965
<i>S. glaucum</i>	CBS 100350	Caule de Bambu morto, Japão	HG965020	HG965068	HG964970
	CBS 456.74	Açúcar, Mauritius	HG965019	HG965067	HG964969
	CBS 796.69 T	Lã, Ilhas de Salomão	FN691454	HE608657	HE608631
	CBS 191.80	Caule de Bambu morto, Colômbia	HG965016	HG965064	HG964966
	UTHSC 07-1181	Escarro, EUA	FN691445	HG965069	HG964971
	CBS 309.74	Ar, acima do campo de cana, Índia	HG965017	HG965065	HG964967
	CBS 382.73	Caule de Bambu morto, Índia	HG965018	HG965066	HG964968
<i>S. hominis</i>	UTHSC 04-3464	Escarro, EUA	HG965013	HG965061	HG964963
	UTHSC 04-1034 T	Tecido de bezerro, EUA	HG965012	HG965060	HG964962
	UTHSC 02-2564	Perna, EUA	HG965011	HG965059	HG964961
<i>S. implicatum</i>	CBS 959.72 T	Solo do deserto, Egito	HG965023	HG965072	HG964974
	CBS 825.73	<i>Saccharum officinarum</i> , Índia	HG965022	HG965071	HG964973

	CBS 397.70A	<i>Saccharum officinarum</i> , Jamaica	HG965021	HG965070	HG964972
	MUCL 4112	Solo de Floresta, EUA	FN706553	HE608659	HE608632
<i>S. kiliense</i>	MUCL 9724	Pele, Alemanha	FN691446	-	HG964975.1
	CBS 122.29 T	Pele, Alemanha	FN691446	HQ232052	HG964975
<i>S. ochraceum</i>	CBS 428.67 T	<i>Zea mays</i> , Quênia	HG965025	HQ232070	HG964977
<i>S. oryzae</i>	CBS 180.74 T	<i>Oryza sativa</i> , Índia	HG965026	HG965047	HG964978
	CBS 399.73	<i>Oryza sativa</i> , Índia	HG965027	HG965048	HG964979
	CBS 414.81	<i>Oryza sativa</i> , Nigéria	HG965028	HG965049	HG964980
<i>S. pseudostrictum</i>	UTHSC 02-1892 T	Escarro, EUA	HG965029	HG965073	HG964981
<i>S. spinificis</i>	Z0504	<i>Spinifex littoreus</i>	KF269096.1	KC920827.1	-
	Z1003	<i>Spinifex littoreus</i>	-	JQ954466.1	-
	S0101	<i>Spinifex littoreus</i>	-	JQ954465.1	-
	Z0106	<i>Spinifex littoreus</i>	-	JQ954463.1	-
<i>S. strictum</i>	CBS 346.70 T	<i>Triticum aestivum</i> , Alemanha	FN691453	HQ232141	HG964982
	CBS 640.75	Madeira em decomposição, Holanda	HG965030	HG965074	HG964983
<i>S. subulatum</i>	MUCL 9939 T	Solo, Egito	HG965031	HG965075	HG964984
	UTHSC 07-110	Osso, EUA	HG965032	HG965076	HG964985
<i>S. summerbellii</i>	CBS 430.70 T	Solo de estufa, Holanda	HG965034	HG965078	HG964987
	CBS	Água no	HG965033	HG965077	HG964986

	200.84	umidificador de ar, Holanda			
	CBS 797.69	Folha em decomposição de <i>Canna indica</i> , Holanda	HG965035	HG965079	KP057619
	CBS 891.73	Folha morta, Sri Lanka	HG965036	HG965080	HG964988
	CBS 951.72	Solo agrícola, Holanda	HG965037	HG965081	HG964989
<i>S. terricola</i>	MUCL 12011	Folha em decomposição de <i>Milleta laurentii</i> , República Democrática do Congo	HG965039	HG965083	HG964991
	UTHSC 04-0956	Sinus, EUA	HG965042.1	-	-
	CBS 134.71	<i>Arundo donax</i> , Itália	HG965038	HG965082	HG964990
	UTHSC 08-3180	Fluido de lavagem bronco alveolar, EUA	FN706541	HG965090	HG964998
	UTHSC 08-844	Fluido de lavagem bronco alveolar, EUA	HG965045	HG965091	HG964999
	UTHSC 07-3667	Fluido de lavagem brônquica, EUA	HG965044	HG965089	HG964997
	UTHSC 07-3260	Osso, EUA	HG965043	HG965088	HG964996
	UTHSC 04-956	Sinus, EUA	HG965042	HG965087	HG964995
	UTHSC 03-2933	Fluido de lavagem brônquica, EUA	HG965041	HG965086	HG964994
	UTHSC 02-1958	Escarro, EUA	FN706540	HG965085	HG964993
	MUCL 42865	Palmeira infectada,	HG965040	HG965084	HG964992

Marrocos

<i>S. zeae</i>	CBS 800.69 T	Talo de <i>Zea mays</i> , EUA	FN691451	HQ232152	HG965000
	CBS 801.69	Desconhecido	HQ232213.1	HQ232152	-

* *Ex-type* estão em negrito e indicados pela letra T.

3.3 Morfologia

Os isolados selecionados foram transferidos para os meios OA (Aveia Agar) (30g de flocos de aveia cozidos em água destilada por 1 hora; 20g de ágar; adição de água destilada para volume final de 1000mL) e BDA. Em seguida foram incubados sob duas diferentes temperaturas, 25 ± 1 e 37 ± 1 °C, no escuro (GIRALDO et al., 2015). Após, foram examinadas após 2, 6, 10 e 14 dias. As colônias foram avaliadas quanto ao diâmetro, a coloração da frente e do reverso e a textura do micélio. As características micromorfológicas foram avaliadas ao 14º dia em meio OA, posicionando fragmentos de colônias em lamínulas com uma gota de lactoglicerol para observação em microscópio de campo claro invertido Zeiss Axio Observer Z1 com Contraste Diferencial de Interferência (DIC) utilizando o software Zen 2012. Para determinar o tamanho médio das estruturas fúngicas, foram medidas cerca de 30 unidades de cada. A observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi realizada com fragmentos de colônias crescidas em OA como descrito acima, fixados em solução Karnovsky (pH 7,2) e desidratados em série de acetona (BOZZOLA; RUSSELL, 1999). A secagem dos *specimens* foi realizada em aparelho de Ponto Crítico (Bal-tec CPD 030 Balzers) seguido de recobrimento com ouro em evaporador Sputter Coater (Bal-tec SCD 050 Balzers). A aquisição das imagens foi realizada com o MEV Zeiss LEO EVO 40 XVP no laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA, utilizando o software Smart Sem, a 20 Kv e distância de trabalho de 6 mm. As imagens obtidas foram editadas utilizando Corel Draw X7.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises Filogenéticas

Na árvore filogenética construída com alinhamento de sequências da região ITS (Figura 1) nota-se que a maioria dos isolados foram agrupados em quatro espécies filogenéticas bem resolvidas, que são *S. spinificis*, *S. terricola*, *S. hominis* e *S. kiliense*. Em cada grupo foram agrupados 73, 5, 1 e 1 isolados, respectivamente. Dezoito isolados ficaram agrupados em um clado não resolvido ‘*Sarocladium* spp.’ (Fig. 1 B e C), contendo sequências de referência de três espécies, *S. bactrocephalum*, *S. pseudostrictum* e *S. strictum*. Não foi possível fazer a identificação e a morfologia dos isolados de *S. hominis* (Pan 54) e de *S. kiliense* (Bra 05), já que eles não cresceram em nenhuma temperatura e em nenhum meio analisados.

Posteriormente, foram feitas outras duas análises filogenéticas utilizando os genes ACT e LSU com 20 dos isolados sequenciados anteriormente, incluindo aqueles do clado ‘*Sarocladium* spp.’ (Fig. 1 B e C). As análises filogenéticas não permitiram a identificação das espécies em clados distintos de alto suporte utilizando as sequências de LSU (Fig. 2). Assim, uma sequência de referência de *S. terricola* alinhou-se também com *S. subulatum* em um clado não suportado incluindo cinco dos isolados do presente estudo (‘*Sarocladium* sp. I’, Fig. 2 A). Além disso, sequências de *S. terricola*, *S. subulatum* e *S. bacillisporum* utilizadas nos alinhamentos ficaram dispostas em um grande clado sem resolução ou suporte (Fig. 2 A, sem destaque). Isso também aconteceu com isolados de *Sarocladium* sp. II. (Fig. 2 B), onde oito isolados foram agrupados em um clado não suportado. Três isolados foram alinhados com *S. bactrocephalum*, e dois com *S. strictum*, ambos em clados bem suportados (Fig. 2 B). Um outro grupo de dois isolados deste estudo foi separado em um outro clado bem suportado, ‘*Sarocladium* sp. III’ (Fig. 2 B).

Na análise filogenética utilizando sequências do gene ACT foi observado que os isolados foram agrupados em quatro espécies filogenéticas bem resolvidas: *S. bactrocephalum*, com três isolados do presente estudo (Fig. 3 A); *S. terricola*, com cinco (Fig. 3 B); e dois clados com isolados não alinhados com sequências de referência, ambos chamados de *Sarocladium* sp. IV e V, com três e cinco isolados, respectivamente (Fig. 3 A). Dois isolados de *Sarocladium strictum* foram agrupados em um clado não suportado (Fig. 3

A). Um isolado de *Sarocladium* sp. VI não alinhou-se com nenhuma sequência de referência (Pan 07, Fig. 3 A).

O gene LSU também foi utilizado por Giraldo et al. (2015) para separar espécies de *Sarocladium* e verificou-se ser este gene, juntamente com ITS e LSU, uma útil ferramenta na definição de espécies. No entanto, no presente trabalho tal gene não foi suficiente para separar as espécies estudadas, alinhando-as em clados não resolvidos ou suportados. O gene ACT foi utilizado por Hirooka et al. (2010), para separar espécies de grupos *Acremonium*-like. Os autores analisaram espécies de *Verruscostoma*. Suas análises moleculares confirmaram que *V. freycinetiae* é uma espécie distinta de outros gêneros, entre os fungos tipo *Nectria* e representa um novo gênero pertencente à família *Bionectriaceae*. No presente trabalho, o gene ACT foi utilizado para separar espécies de *Sarocladium*, que também é um gênero *Acremonium*-like, e foi eficiente em separar as espécies em clados bem resolvidos ou suportados. Entretanto, isso não ocorreu para os isolados alinhados a sequências de *S. spinificis* na análise feita com ITS, com agrupamentos não suportados para ACT ou LSU. Além disso, na análise feita com ACT não houve suporte no agrupamento dos isolados com *S. strictum*. Isso mostra que novas análises filogenéticas são necessárias ainda para a identificação dos isolados *Sarocladium* sp., como a combinação das sequências de ITS, LSU e ou ACT concatenadas, ou mesmo o sequenciamento de uma ou mais novas regiões para definir se os isolados ainda não identificados são espécies já conhecidas ou serão caracterizados como uma ou mais novas espécies de *Sarocladium*.

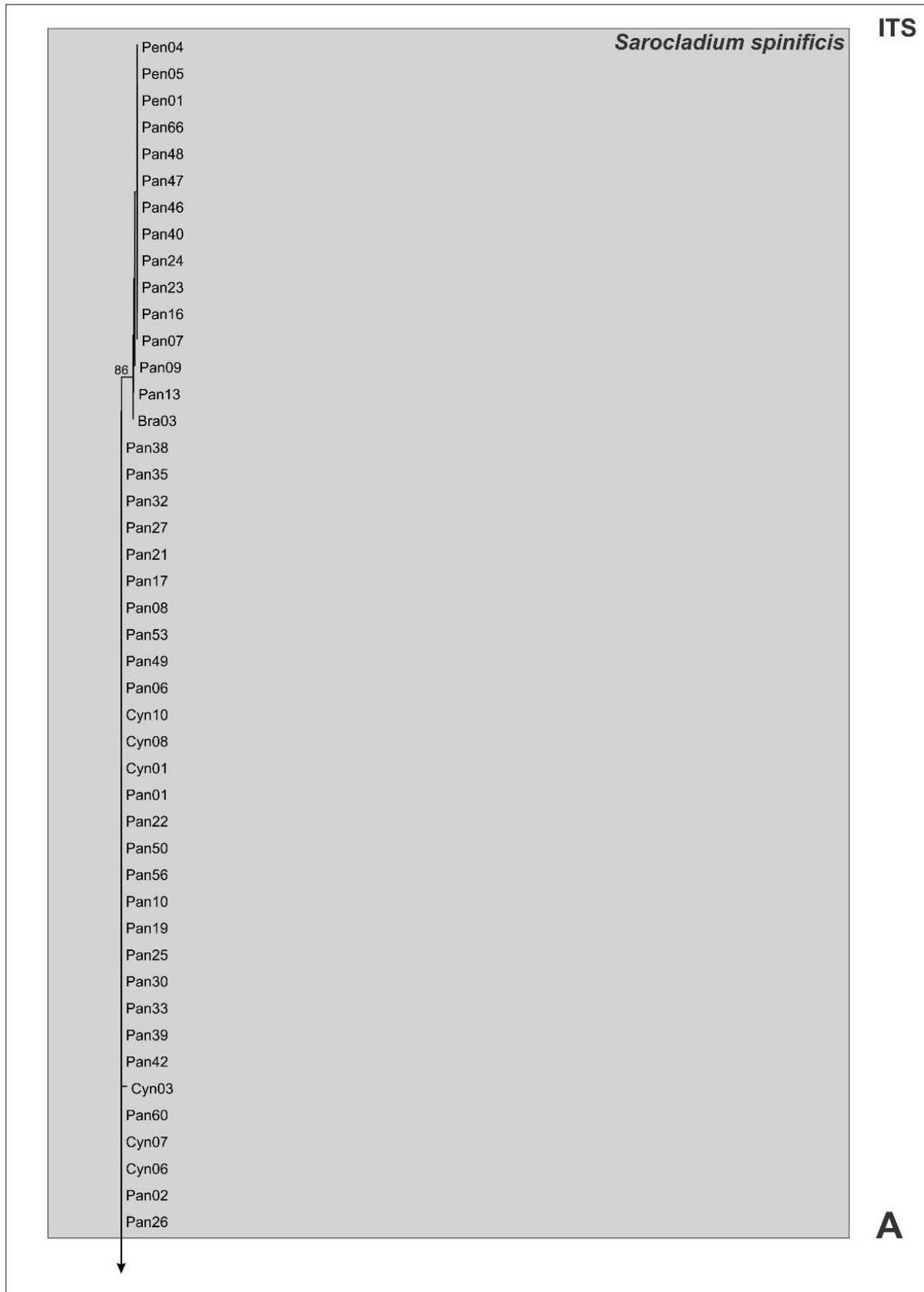


Figura 1 – Árvore de Máxima Verossimilhança obtida a partir de análise com sequências de DNA do gene ITS. Clados formados têm suporte indicado pelo teste de bootstrap com 1000 pseudo replicatas. Isolados *Ex-type* estão em negrito e indicados pela letra T.

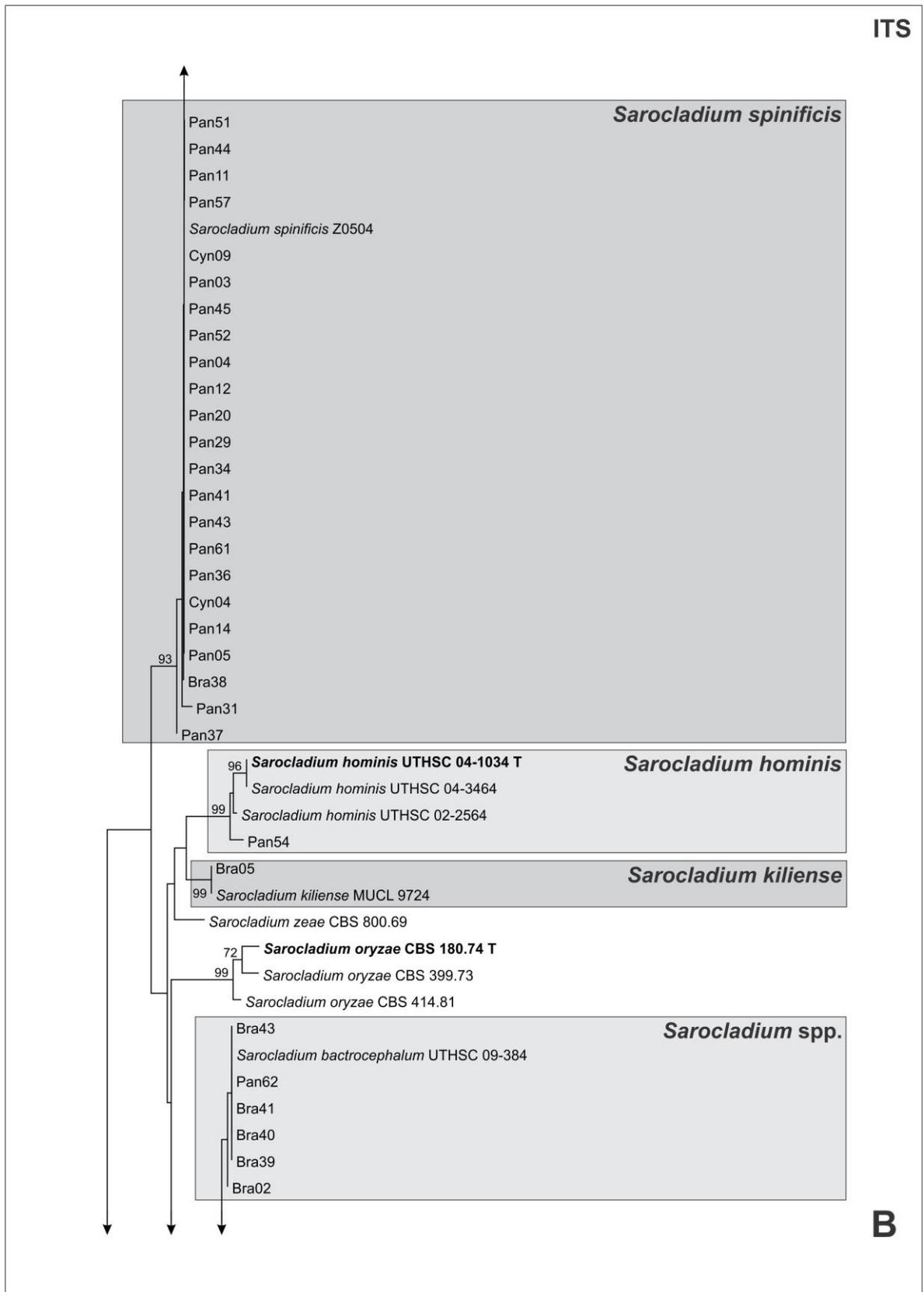


Figura 1 – Continuação.

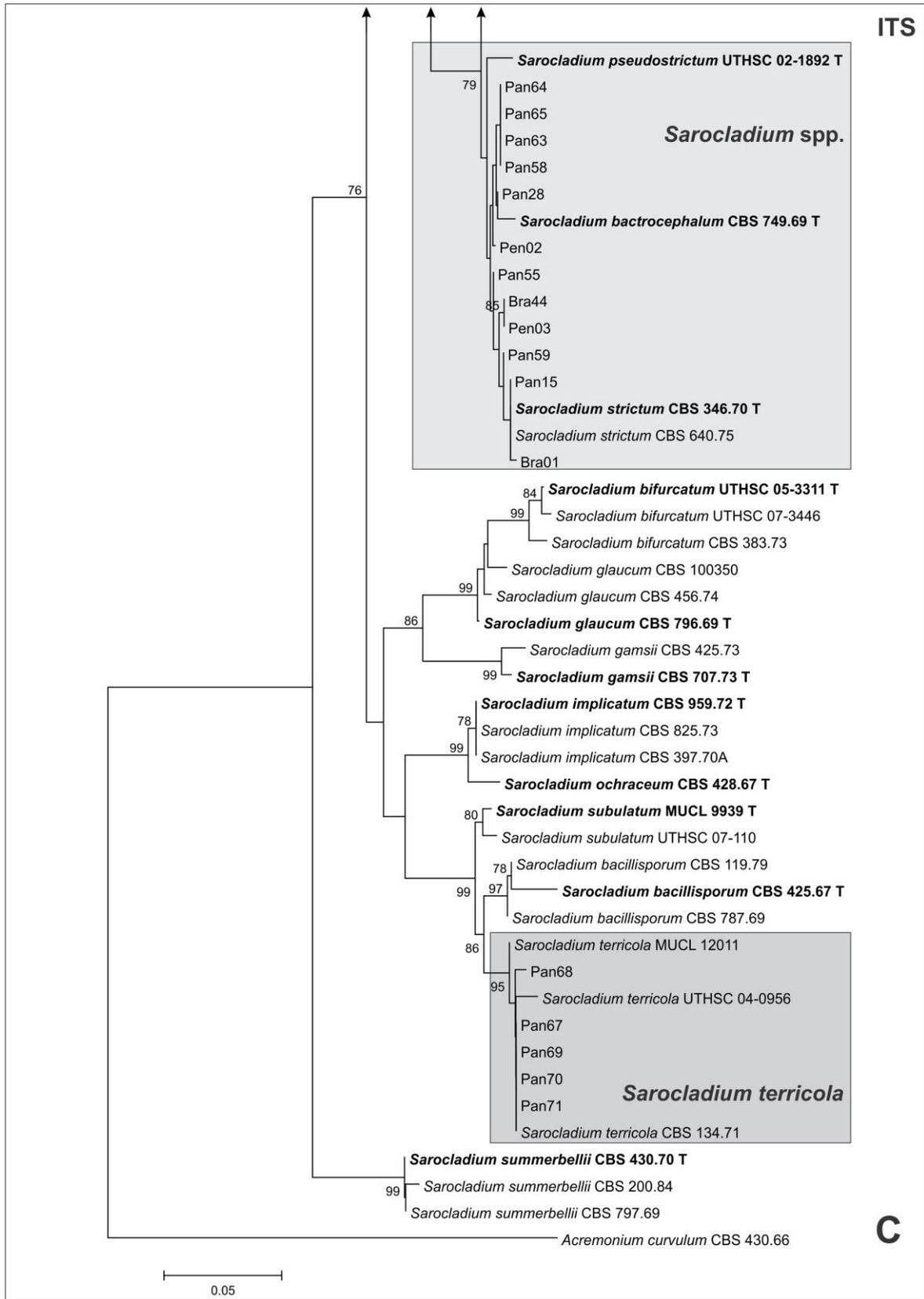


Figura 1 – Continuação.

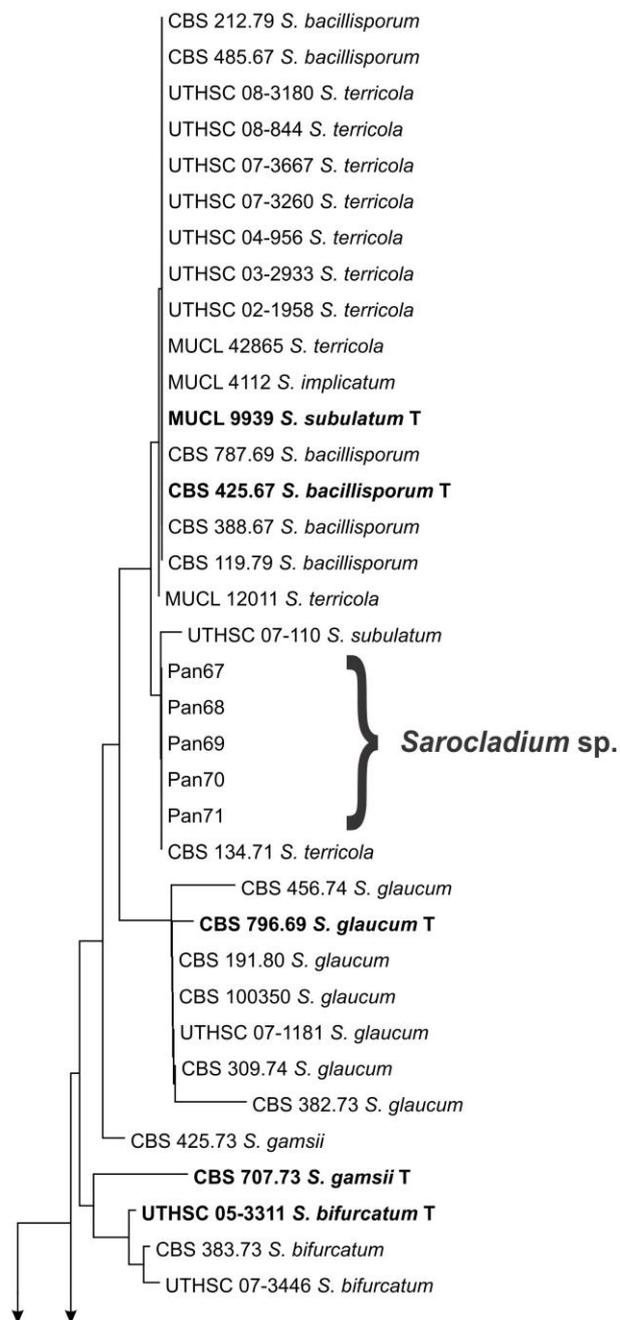
**A**

Figura 2 - Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir de análise com sequências de DNA do gene LSU. Clados formados têm suporte indicado pelo teste de bootstrap com 1000 pseudo replicatas. Isolados *Ex-type* estão em negrito e indicados pela letra T.

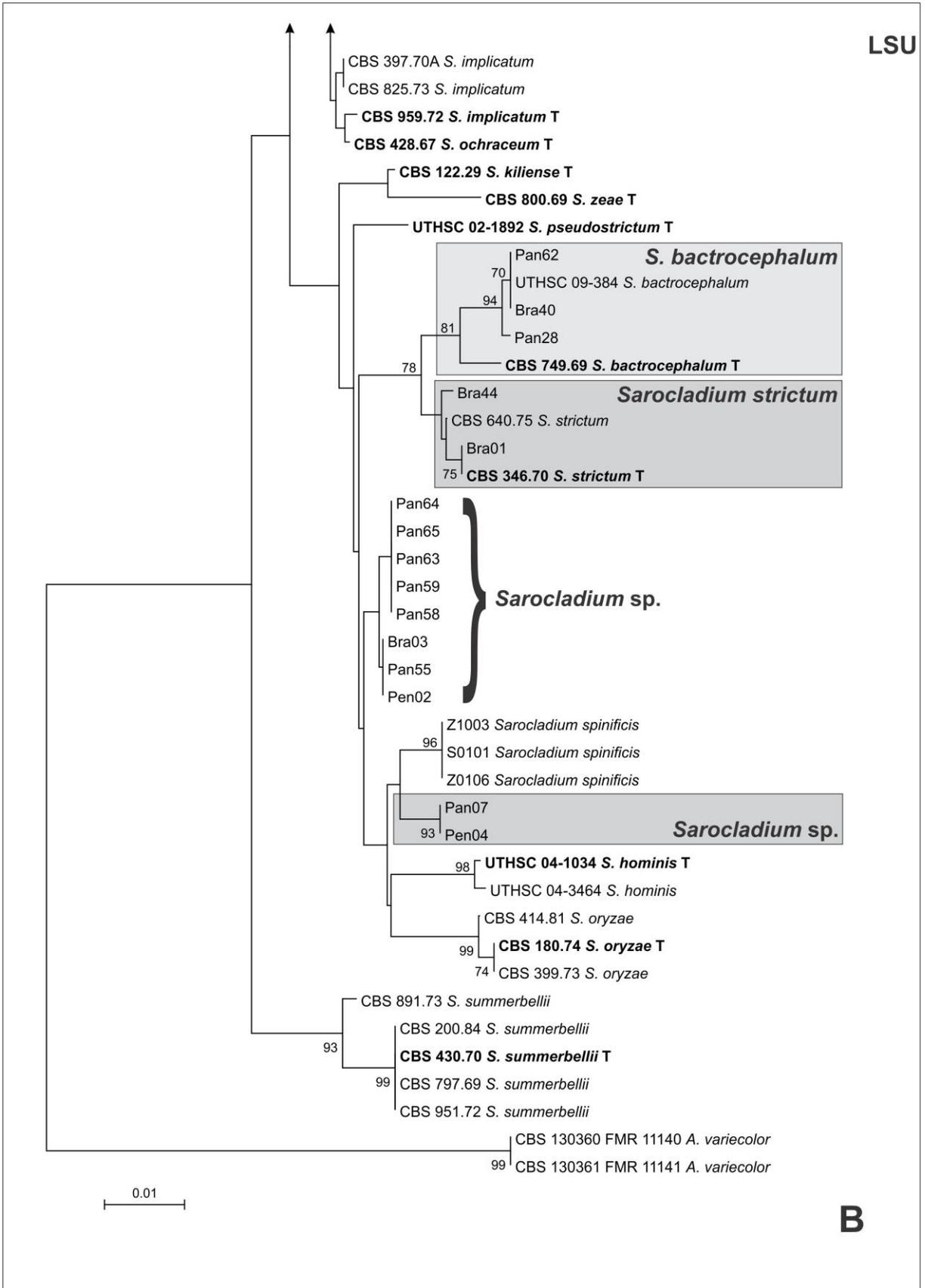


Figura 2 – Continuação.

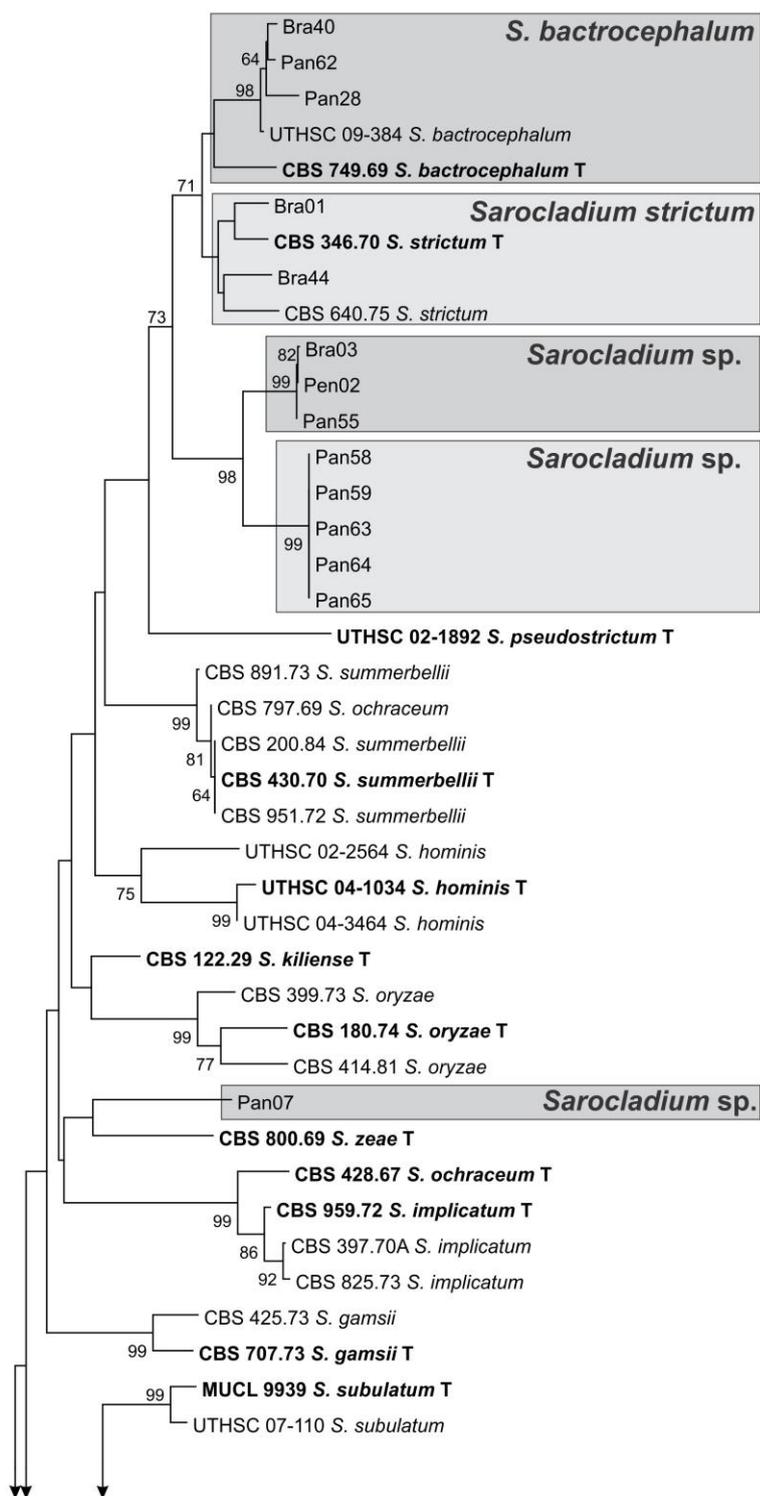


Figura 3 - Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir de análise de seqüências de DNA do gene ACT. Clados formados têm suporte indicado pelo teste de bootstrap com 1000 pseudo replicatas. Isolados *Ex-type* estão em negrito e indicados pela letra T.

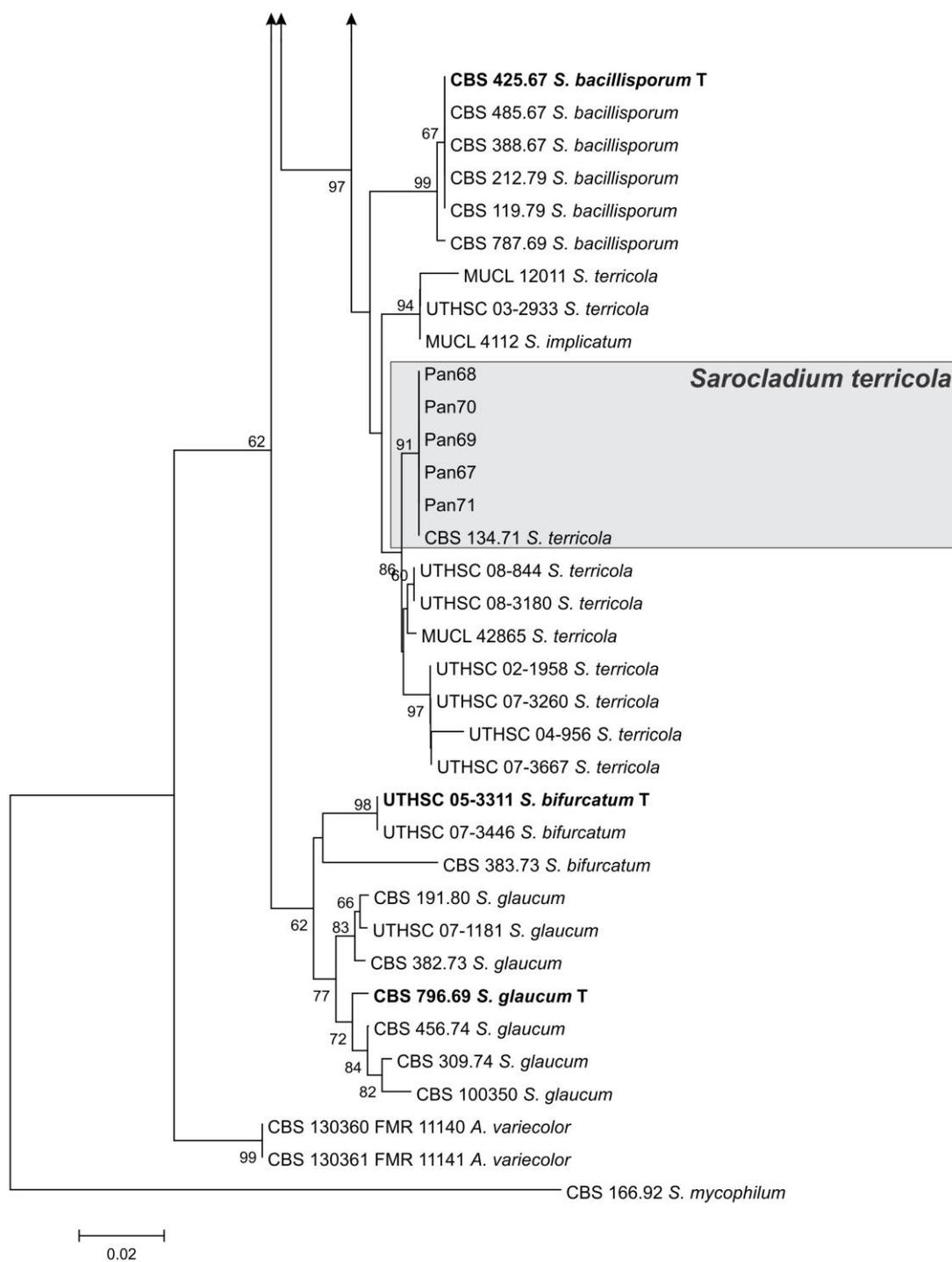


Figura 3 – Continuação.

4.2 Morfologia

Os estudos fenotípicos a seguir foram realizados para caracterizar os grupos de isolados de cada espécie identificada, além daqueles ainda não identificados em nível de espécie. Características macro e micromorfológicas gerais estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização de isolados de *Sarocladium* cultivados em meios BDA (macromorfologia e temperatura de crescimento) e OA (micromorfologia) após 14 dias.

Espécies	Colônias*		Conídios*	Adelofiálides*	Esquizofiálides*	Crescimento 25°C / 37°C
	Diâmetro / Coloração	Forma / Tamanho				
<i>S. strictum</i> Isolados BRA 01; BRA 44	45–47mm / Amarelo rosado - Amarelo rosado	Produção em Falsas cabeças – Cilíndricos / 1,4–2,3×4,2–4,4µm	Presente	Não observado	+ / -	
<i>S. spinificis</i> Isolados PEN 04; PAN 07	41–43mm / Branco – Amarelo claro	Produção em Falsas cabeças - Cilíndricos / 2,2–2,7×4,4–5,2µm	Presente	Não observado	+ / -	
<i>S. bactrocephalum</i> Isolados PAN 28; PAN 62; BRA 40	35–47mm / Laranja claro – Laranja claro	Produção em Falsas cabeças - Cilíndricos / 2,0–2,3×3,8–4,9µm	Não observado	Não observado	+ / -	
<i>Sarocladium</i> sp. Isolados PAN 55; PAN 58; PAN 59; PAN 63; PAN 64; PAN 65; BRA 03; PEN 02	39–52mm / Branco – Amarelo claro	Produção em Falsas cabeças - Cilíndricos / 2,2–2,7×4,4–5,2µm	Presente	Não observado	+ / -	
<i>S. terricola</i> Isolados PAN 67; PAN 68; PAN 69; PAN 70; PAN 71	39–40mm / Branco – Laranja claro	Produção em Cadeias - Fusiformes / 2,2– 2,7×4,2–4,9µm	Presente	Não observado	+ / -	

*características observadas para colônias desenvolvidas a 25°C.

4.2.1 *Sarocladium spinificis*

Setenta e três isolados foram identificados como *S. spinificis* por análise filogenética utilizando sequências de ITS. As colônias em meio OA atingiram 48–50 mm de diâmetro em média, com coloração hialina. Em BDA as colônias atingiram 41–43 mm em média e apresentaram coloração branca e no reverso amarelo claro e com aspecto pulverulento. No tempo de 14 dias, os isolados não apresentaram exsudato. Fiálides medindo 24 µm de comprimento em média, de coloração hialina e de paredes lisas. Foram observados adelofiálides, fiálides curtas sem septo basal. Não foram observadas esquizofiálides. Apresentaram produção de conídios em cabeças. Os conídios eram cilíndricos ou elipsoidais, de tamanho 2,5–2,7×5–5,1 µm, e de coloração hialina. Não foram observados clamidósporos. Houve crescimento a 25°C, e não houve a 37°C.

Sarocladium spinificis foi recentemente descrito por Yeh e Kirschner (2014), isolado a partir de plantas de *Spinifex littoreus*. Em seus estudos os isolados foram cultivados nos meios BDA, extrato de malte e CMA, e apresentaram coloração amarela, laranja claro e branca, respectivamente. No presente estudo, os isolados foram colocados apenas nos meios OA e BDA e, neste último pode-se observar uma coloração mais clara do que a relatada por estes autores. Além disso, estes observaram a presença de um pigmento amarelo solúvel, o que não foi observado nos isolados do presente estudo. As características microscópicas observadas por eles também puderam ser observadas neste estudo. Como exemplo, não observou-se ramificação dos conidióforos e os conídios são relativamente longos, características estas únicas da espécie. Utilizando técnicas moleculares, isolados microbianos retirados de costas hipersalinas foram identificados como *S. strictum*, (como *Acremonium strictum*, CANTRELL et al., 2013), indicando que espécies de *Sarocladium* podem ter a capacidade de crescer em ambientes com alta salinidade (RODRIGUEZ et al., 2008). Em 2014, *S. spinificis* foi descrito como endofítico de uma forrageira de um habitat costeiro, o que significa, segundo os autores, que esta espécie pode ter uma função semelhante à de outros endófitos que conferem tolerância ao sal em plantas costeiras (YEH; KIRSCHNER, 2014).

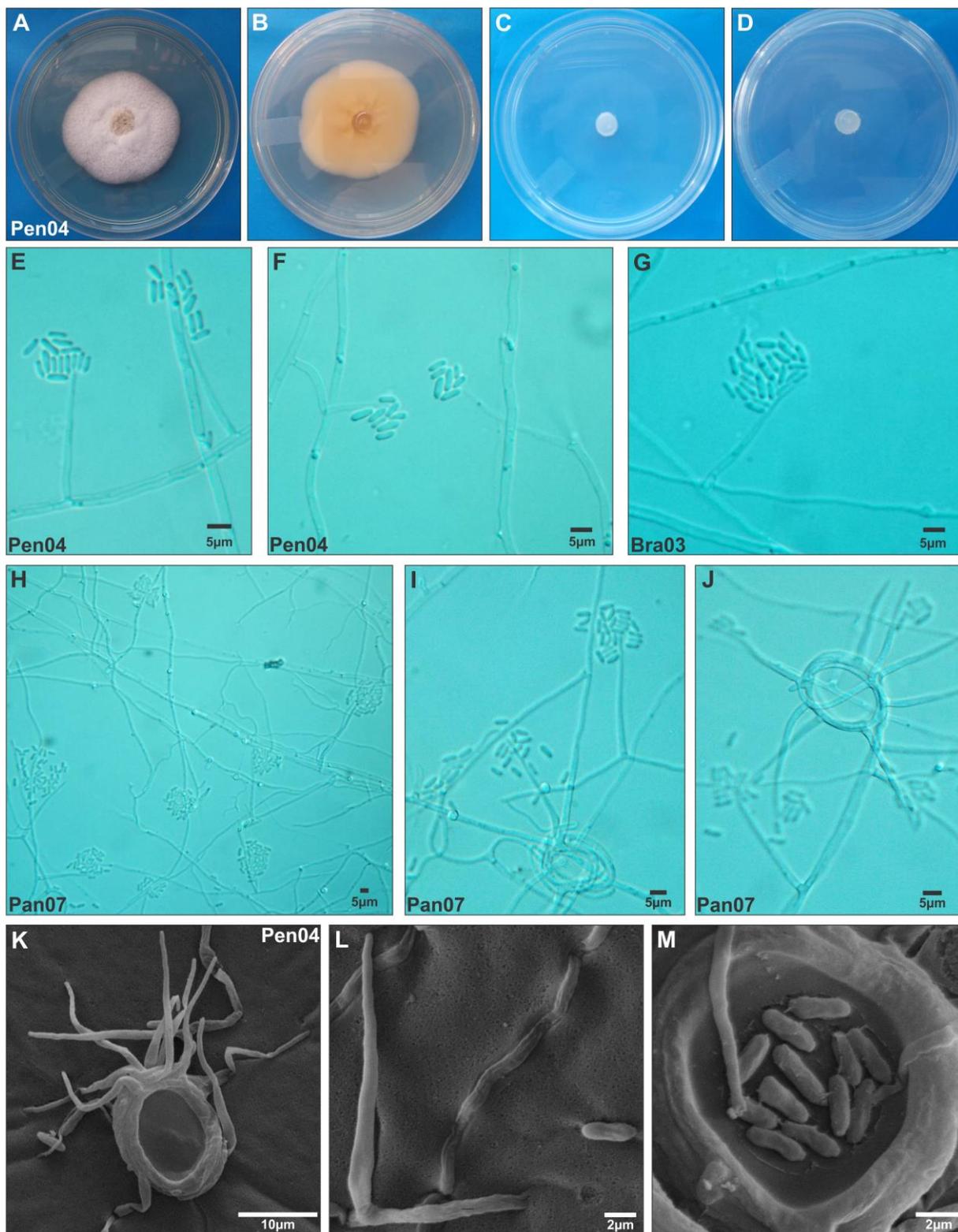


Figura 4 – A – D Colônias de *Sarocladium spinificis* em meio BDA (A e B) e OA (C e D) após 14 dias de incubação a 25 °C, no escuro; E – J: Micrografias de microscopia de campo claro: E, F e G – Fiálides produzindo conídios em falsas cabeças; H – Hifas, Fiálides e conídios em falsas cabeças; I e J - Fiálides produzindo conídios em falsas cabeças e enrolamento de hifas; K – M Eletromicrografias de Varredura: K – Fiálides e enrolamento de hifas; L – Fiálide e hifas entrando e saindo do meio de cultivo; M – Conídios cilíndricos.

4.2.2 *Sarocladium terricola*

Cinco isolados (Pan67, Pan68, Pan69, Pan70 e Pan71) foram identificados como *S. terricola* pelos estudos filogenéticos com regiões ITS e ACT, e agrupados com sequências de referência de *S. terricola* e *S. subulatum* na análise com LSU. As colônias em meio OA atingiram 46–50 mm de diâmetro em média, com coloração hialina. Em BDA as colônias atingiram 39–40 mm em média e apresentaram coloração branca e no reverso laranja claro com alguns sulcos no centro e com aspecto algodinoso. No tempo de 14 dias, os isolados não apresentaram exsudato. Os conidióforos analisados foram eretos e simples, com poucas ramificações, hialinos e de paredes lisas. Fiálides medindo 19 µm em média, de coloração hialina e de paredes lisas. Foram observados adelofiálides e não ocorreram esquizofiálides. Apresentaram conídios fusiformes em longas cadeias de tamanho 2,2–2,7×4,2–4,9 µm, e de coloração hialina. Não foram observados clamidósporos. Os isolados apresentaram crescimento na temperatura de 25°C e não houve crescimento à temperatura de 37°C.

A espécie *S. terricola* foi renomeada por Giraldo et al. (2015). Anteriormente era chamada *Sagrahamala terricola*. Os autores avaliaram os isolados nos meios OA e BDA, assim como no presente estudo, porém a coloração encontrada por eles no meio OA foi branca e no reverso laranja claro, diferente do resultado observado no presente estudo. Já no meio BDA a coloração observada foi a mesma nos dois estudos. Giraldo et al. (2015) também observaram a presença de esquizofiálides e adelofiálides, porém, no presente estudo, ocorreram somente adelofiálides. Os conídios observados pelos autores apresentaram as extremidades pontiagudas e não havia clamidósporos, assim como analisado neste estudo.

Sarocladium terricola é uma espécie comumente encontrada no solo e em plantas em países tropicais e subtropicais (ONIONS; BARRON 1967; GAMS 1971). No presente estudo, as cepas foram isoladas de gramíneas forrageiras no Brasil. No entanto, nos estudos de Giraldo et al. (2015) a maioria das cepas foram de origem clínica. Apesar de *S. terricola* nunca ter sido descrito como o agente etiológico de qualquer doença humana, seu isolamento repetido de amostras humanas, principalmente do trato respiratório, sugeriria um possível papel patogênico. Porém nas temperaturas analisadas por eles, não houve crescimento a 37 °C, sendo a temperatura de maior crescimento a de 35 °C. No presente estudo também não houve crescimento a 37 °C, somente a 25 °C. A temperatura de 35 °C não foi avaliada.

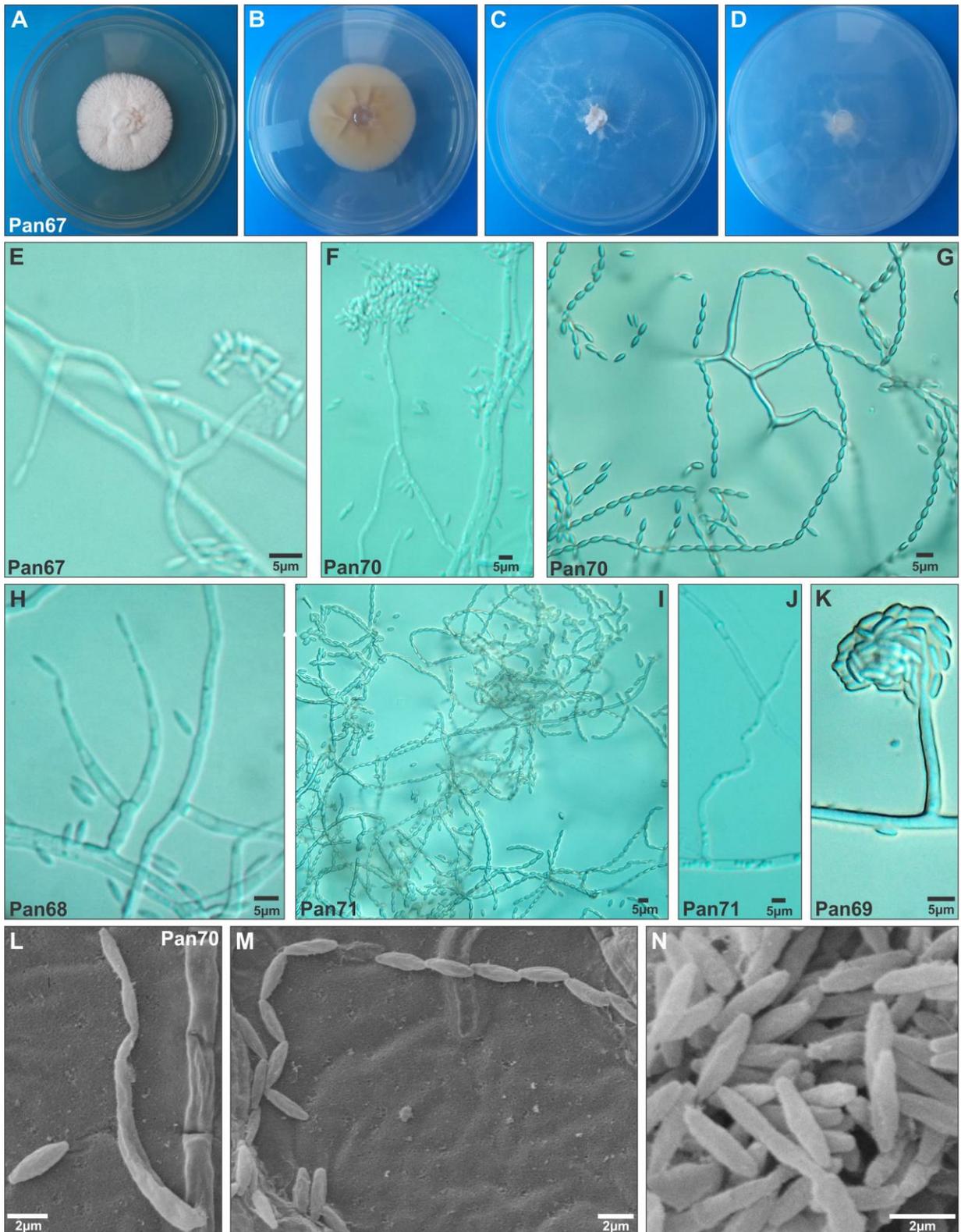


Figura 5 – A – D Colônias de *Sarocladium terricola* em meio BDA (A e B) e OA (C e D) após 14 dias de incubação a 25 °C, no escuro; Micrografias de microscopia de campo claro: E e F – Fiálides produzindo conídios; G – Fiálides produzindo conídios em longas cadeias; H – Fiálides ramificadas. I – Conídios em longas cadeias; Fiálides e conídios em falsas cabeças; J – Hifas; K - Fiálides produzindo conídios em falsas cabeças; Eletromicrografias de Varredura: L – Fiálides produzindo conídeos; M e N – Conídios fusiformes e em longas cadeias.

4.2.3 *Sarocladium strictum*

Dois isolados (Bra01 e Bra44) foram identificados como *S. strictum* por meio de análises feitas com sequências dos genes ACT e LSU e estes foram agrupados na árvore filogenética de ITS com sequências de referências de *S. strictum*, *S. pseudostrictum* e *S. bactrocephalum*. As colônias em meio OA atingiram 41–45 mm de diâmetro em média, com coloração hialina. Em BDA as colônias atingiram 45–47 mm em média e apresentaram coloração amarelo rosada e no reverso também amarelo rosado e com aspecto algodinoso. No tempo de 14 dias, os isolados não apresentaram exsudato. Os conidióforos analisados foram eretos e simples, sem ramificações, hialinos e de paredes lisas. Fiálides medindo 28 µm em média, de coloração hialina e de paredes lisas. Foram observados adelofiálides e não observou-se esquizofiálides. Apresentaram conídios produzidos em cabeças. Os conídios apresentaram forma cilíndrica ou elipsoidal, de tamanho 1,4–2,3×4,3–4,4 µm, e de coloração hialina. Foram observados clamidósporos. Os isolados apresentaram crescimento na temperatura de 25 °C e não houve crescimento à temperatura de 37 °C.

A espécie *S. strictum* foi transferida para o gênero *Sarocladium*, por Summerbell et al. (2011) quando estudaram a subunidade maior do DNA ribossômico de fungos (LSU). Anteriormente a espécie estava alocada no gênero *Acremonium*. Segundo DOMSCH; GAMS; ANDERSON (2007), *S. strictum* é uma espécie que possui poucas características particulares, por ser muito variável. Nela os conidióforos ramificados estão geralmente ausentes e as colônias geralmente cor de rosa, já os conídios são mais curtos do que nas demais espécies (GAMS, 1971; DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 2007). Porém, podem ser observadas colônias alaranjadas e conidióforos ocasionalmente ramificados (DE HOOG et al., 2000). A espécie também forma adelofiálides proeminentes, o que também pode ser visto no presente estudo.

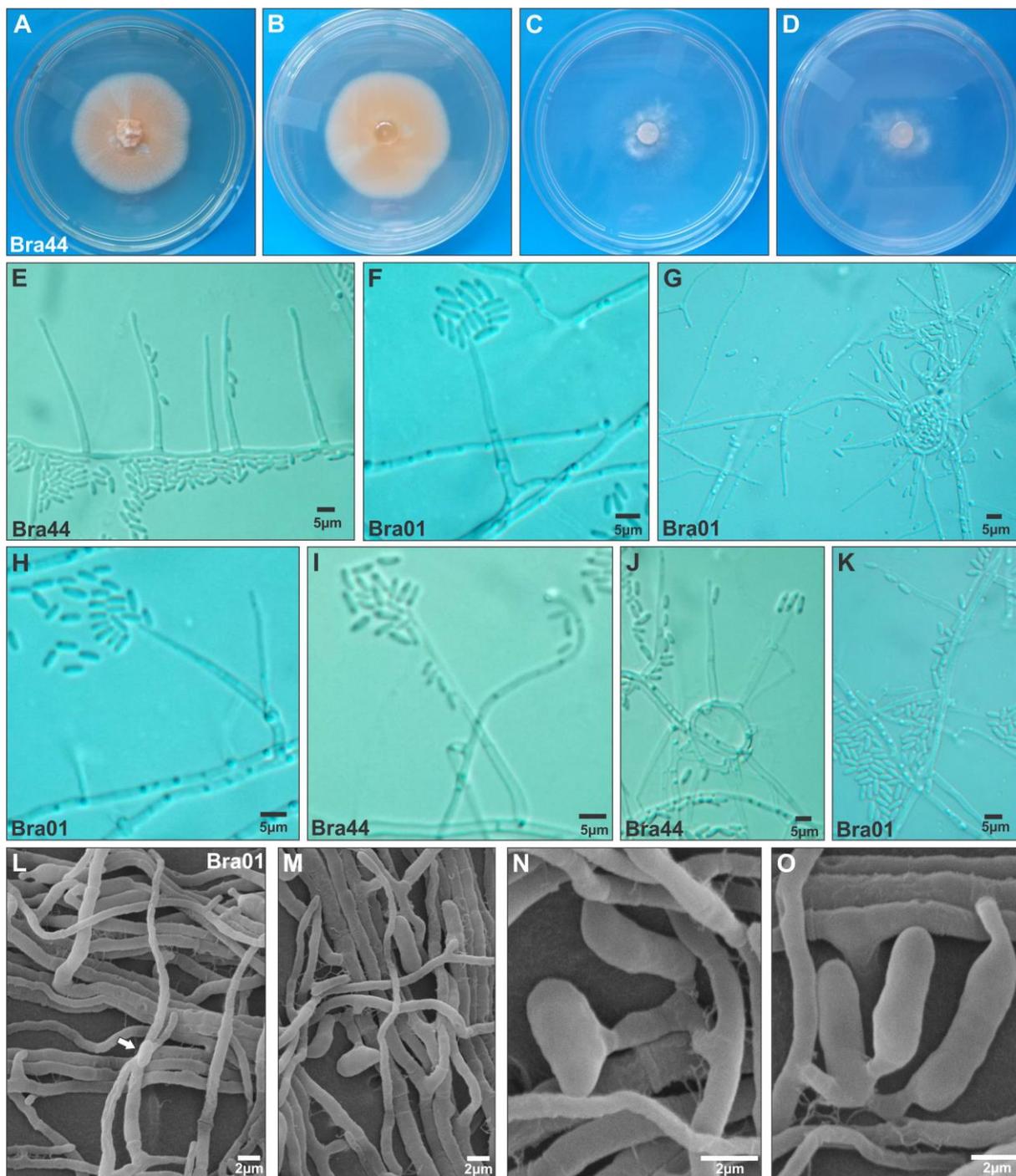


Figura 6 – A – D Colônias de *Sarocladium strictum* em meio BDA (A e B) e OA (C e D) após 14 dias de incubação a 25 °C, no escuro; Micrografias de microscopia de campo claro: E – Fiálides; F – Fiálides produzindo conídios em falsas cabeças; G – Hifas, fiálides e conídios; H, I e J – Hifas, fiálides e conídios em falsas cabeças e enrolamento de hifas; K – Hifas, fiálides e conídios; Eletromicrografias de Varredura: L e M – Fiálide e hifas; N e O – Conídios cilíndricos.

4.2.4 *Sarocladium bactrocephalum*

Três isolados (Pan28, Pan62 e Bra40) foram identificados como *S. bactrocephalum* utilizando sequências de LSU e ACT nas análises filogenéticas. Estes foram agrupados na árvore filogenética de ITS com sequências de referências de *S. strictum*, *S. pseudostrictum* e *S. bactrocephalum*. As colônias em meio OA atingiram 37–50 mm de diâmetro, com coloração hialina. Em BDA as colônias atingiram 35–47 mm e apresentaram coloração laranja claro e no reverso também laranja claro e com aspecto algodinoso. No tempo de 14 dias, os isolados não apresentaram exsudato. Os conidióforos reduzidos a células conidiogênicas. Fiálides medindo 20µm, de coloração hialina e de paredes lisas. Não foram observados adelofiálides e esquizofiálides. Apresentaram conídios produzidos em cabeças. Os conídios apresentaram formato cilíndrico ou elipsoidal, de tamanho 2,0–2,3×3,8–4,9 µm, e de coloração hialina. Não foram observados clamidósporos. Os isolados apresentaram crescimento na temperatura de 25 °C e não houve crescimento à temperatura de 37 °C.

Assim como para a espécie *S. strictum*, *S. bactrocephalum* anteriormente pertencia ao gênero *Acremonium* e foi transferida para *Sarocladium* por Summerbell et al. (2011). Segundo Gams (1971), esta espécie está intimamente relacionada com *S. strictum*, e é distinguida morfológicamente por seus conídios longos e estreitos, sendo molecularmente distinguível utilizando sequências de LSU.

Nos estudos de Giraldo et al. (2015), nota-se uma outra espécie que também se agrupa com *S. strictum* e *S. bactrocephalum* em um clado bem suportado, a *S. pseudostrictum*, onde se correlaciona a similaridade morfológica das três espécies. Contudo, podem ser observadas pequenas diferenças. *Sarocladium pseudostrictum* tem uma taxa de crescimento mais rápida em BDA, maiores fiálides, os conidióforos são geralmente ramificados, produzem adelofiálides e seus conídios são mais longos. Já *S. bactrocephalum* tem uma taxa de crescimento mais lenta, colônias brancas no meio BDA, os conídios são mais estreitos e as fiálides mais curtas quando comparadas a *S. pseudostrictum*. No presente estudo, os isolados de *S. bactrocephalum* apresentaram coloração diferente daquela observada por Giraldo et al. (2015) e a taxa de crescimento foi maior quando comparadas as taxas de crescimento dos isolados analisados por estes mesmos pesquisadores.

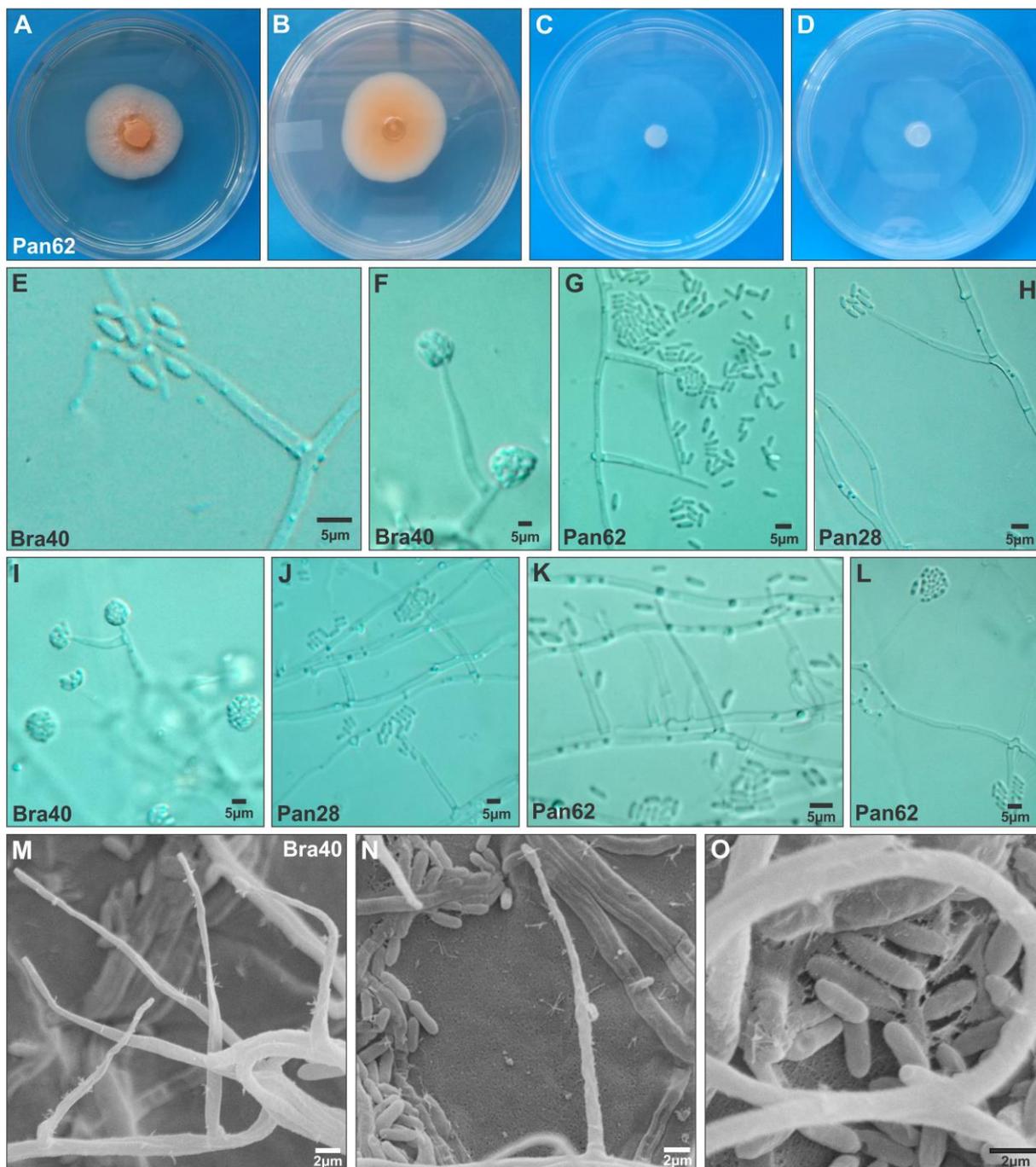


Figura 7 – A – D Colônias de *Sarocladium bactrocephalum* em meio BDA (A e B) e OA (C e D) após 14 dias de incubação a 25 °C; Micrografias de microscopia de campo claro: E - J – Fiálides produzindo conídios em falsas cabeças; K – Hifas, Fiálides e conídios; Eletromicrografias de Varredura: L - Fiálides produzindo conídios em falsas cabeças; M – Fiálides; N – Fiálide e conídios; O – Conídios cilíndricos.

4.2.5 *Sarocladium* sp.

Oito isolados (Pan55, Pan58, Pan59, Pan63, Pan64, Pan65, Bra03 e Pen02) não foram identificados em nível de espécie, e em futuros estudos será verificada a hipótese de que seja(m) nova(s) espécie(s). As colônias em meio OA atingiram 46–59 mm de diâmetro em média, com coloração hialina. Em BDA as colônias atingiram 39–52 mm em média e apresentaram coloração branca e no reverso amarelo claro e com aspecto algodinoso. No tempo de 14 dias, os isolados não apresentaram exsudato. Os conidióforos reduzidos a células conidiogênicas. Fiálides com 25µm em média, de coloração hialina e de paredes lisas. Foram observados adelofiálides, mas não esquizofiálides. Apresentaram conídios produzidos em cabeças. Os conídios foram cilíndricos ou elipsoidais, de tamanho 2,2–2,7×4,4–5,2 µm, e de coloração hialina. Não foram observados clamidósporos. Os isolados apresentaram crescimento na temperatura de 25 °C e não houve crescimento à temperatura de 37 °C.

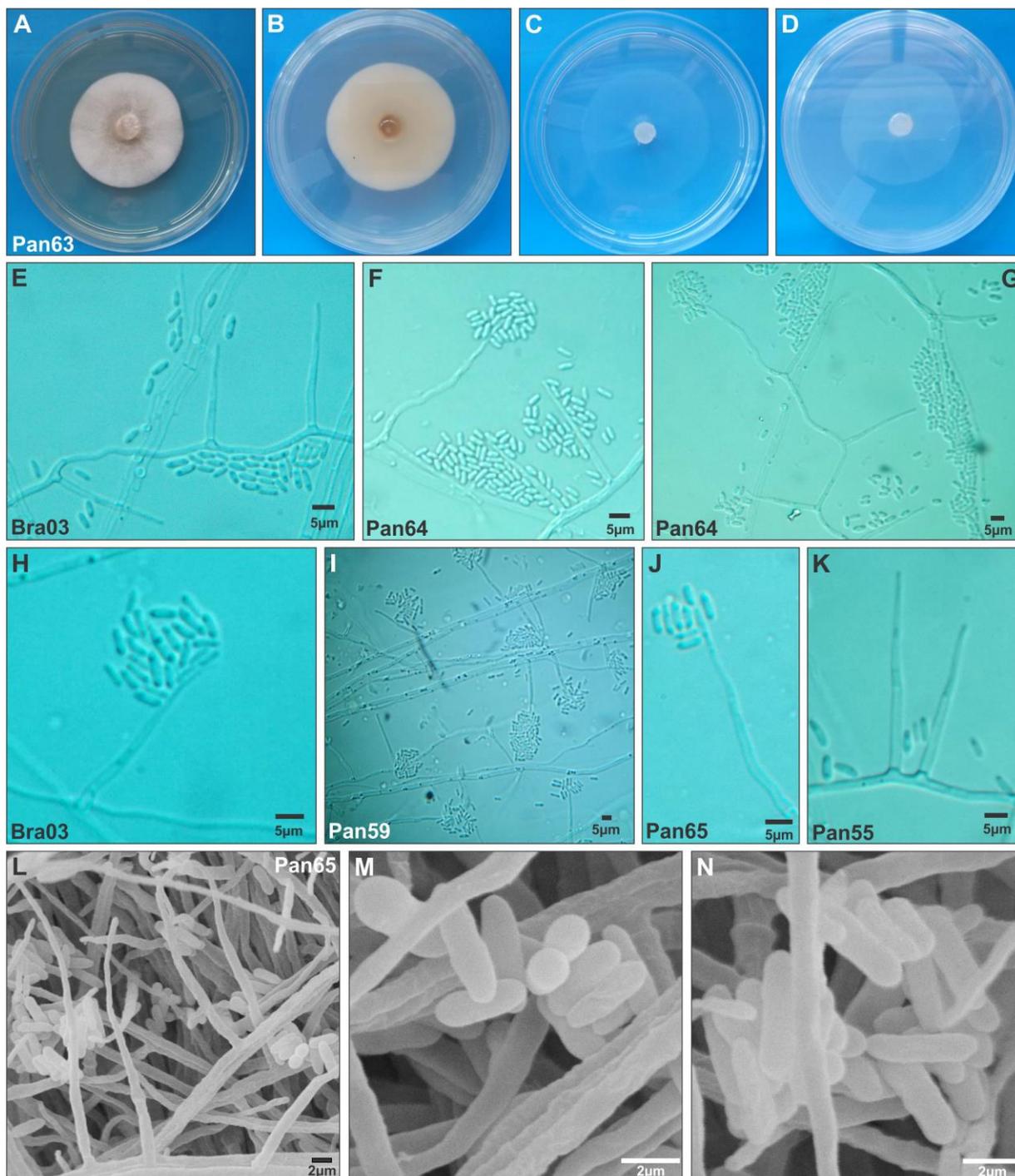


Figura 8 – Isolados de *Sarocladium* não identificados em nível de espécie. A – D - Colônias em meio BDA (A e B) e OA (C e D) após 14 dias de incubação a 25 °C, no escuro; Micrografias de microscopia de campo claro: E – Fiálides e conídios; F - J – Fiálides produzindo conídios em falsas cabeças; K – Fiálides; Eletromicrografias de Varredura: L - Fiálides e conídios; M e N – Conídios cilíndricos.

5 CONCLUSÃO

Os isolados endofíticos do gênero *Sarocladium* obtidos a partir das gramíneas *Brachiaria ruziziensis*, *B. brizantha*, *Panicum maximum* e *Penisetum purpureum* e *Cynodon nlemfuensis* foram identificados e analisados molecular e morfológicamente como *S. terricola*, *S. bactrocephalum*, *S. spinificis*, *S. strictum* e *Sarocladium* sp. II em LSU e VI e V em ACT.

Novas análises serão necessárias para definir se os isolados de *Sarocladium* sp. são espécies já conhecidas na literatura ou serão caracterizados como uma ou mais novas espécies de *Sarocladium*.

REFERÊNCIAS

AMIN, K. S.; SHARMA, B. D.; DAS C. R. Occurrence in India of sheath-rot of rice caused by *Acrocyllindrium*. **Plant Disease Reporter**, v. 58, n. 4, p. 358-360, 1974.

ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, 2003.

ARNOLD, A.E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?. **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 541-549, 2007.

AYYADURAI, N.; KIRUBAKARAN, S. I.; SRISHA, S.; SAKTHIVEL, N. Biological and molecular variability of *Sarocladium oryzae*, the sheath rot pathogen of rice (*Oryza sativa* L.). **Current microbiology**, v. 50, n. 6, p. 319-323, 2005.

AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana**, p. 117-137, 1998.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada?. **Virus**, v. 5000, n. 130000, p. 3-8, 1999.

BEAUDREUIL, S.; MATTHIAS, B.; NAJJAR, A. A.; BASTIDES, F.; FRANCOIS, M.; DUONG, T. H.; NIVET, H.; DOMINIQUE, R. L. Acute septic arthritis after kidney transplantation due to *Acremonium*. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. 4, p. 850-851, 2003.

BILLS, G. F.; PLATAS, G.; GAMS, W. Conspicuity of the cerulenin and helvolic acid producing '*Cephalosporium caerulens*', and the hypocrealean fungus *Sarocladium oryzae*. **Mycological research**, v. 108, n. 11, p. 1291-1300, 2004.

BOA, E. R.; BRADY, B. L. *Sarocladium oryzae* associated with blight of *Bambusa* species in Bangladesh. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 89, n. 2, p. 161-166, 1987.

BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. **Jones & Bartlett Learning**, 1999.

BRADY, B. L. *Sarocladium oryzae*. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria n. 673, 1980a.

BRIDGE, P. D.; HAWKSWORTH, D. L.; KAVISHE, D. F.; FARNELL, P. A. A revision of the species concept in *Sarocladium*, the causal agent of sheath-rot in rice and bamboo blight, based on biochemical and morphometric analyses. **Plant pathology**, v. 38, n. 2, p. 239-245, 1989.

BRILMAN, L. A. Endophytes in turfgrass cultivars. **Neotyphodium in cool-season grasses**, p. 341-349, 2005.

CANTRELL, S. A.; GUNDE-CIMERMAN, N.; ZALAR, P.; ACEVEDO, M.; BÁEZ-FÉLIX, C. Fungal communities of young and mature hypersaline microbial mats. **Mycologia**, v. 105, n. 4, p. 827-836, 2013.

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.

CHAKRAVARTY, D. K.; BISWAS, S. Estimation of yield loss in rice affected by sheath rot [*Acrocyndrium oryzae*]. **Plant Disease Reporter**, 1978.

CHEN, J. D.; ZHANG, G. C.; FU, X. H. The pathogen of rice purple sheath disease *Sarocladium sinense* sp. nov. **Acta Mycologica Sinica, Supplement**, v. 1, p. 318-327, 1986.

CHEN, X. M. LINE, R. F.; LEUNG, H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. **Phytopathology**, v. 83, n. 12, p. 1489-1497, 1993.

CHIEN, C. C.; HUANG, C. H. relation between sheath rot and the sterility of rice plant. **Chung-hua nung yeh yen chiu Journal of agricultural research of China**, 1979.

CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **The American Naturalist**, v. 160, n. S4, p. S99-S127, 2002.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M. J. Atlas of clinical fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures. **Universitat Rovira i Virgili**, 2000.

DOMSCH K. H.; GAMS W.; ANDERSON T-H. Compendium of soil fungi. 2nd edition. **Eching: IHW-Verlag**, 2007.

FAETH, S. H.; FAGAN, W. F. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 2, p. 360-368, 2002.

FROEHLICH, J; HYDE, K. D.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research**, v. 104, n. 10, p. 1202-1212, 2000.

GAMA, D. S. Fungos endofíticos em *Brachiaria* e *Cynodon*. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal de Lavras, 2014.

GAMS, W. *Cephalosporium*-artige schimmelpilze (Hyphomycetes). 1971.

GAMS, W. Phialides with solitary conidia? Remarks on conidium ontogeny in some Hyphomycetes. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 161-169, 1973.

GAMS, W; HAWKSWORTH, D. L. Identity of *Acrocyndrium oryzae* Sawada and a similar fungus causing sheath-rot of rice. **Kavaka**, 1975.

GIMENEZ, C.; CABRERA, R.; REINA, M.; GONZALEZ-COLOMA, A. Fungal endophytes and their role in plant protection. **Current Organic Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 707-720, 2007.

- GIRALDO, A.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; MADRID, H.; DE HOOG, G.S.; CANO, J.; DECOCK, C.; CROUS, P.W.; GUARRO, J. Phylogeny of *Sarocladium* (Hypocreales). **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 34, n. 1, p. 10-24, 2015.
- GHOSH, M. K. AMUDHA, R.; JAYACHANDRAN, S.; SAKTHIVEL, N. Detection and quantification of phytotoxic metabolites of *Sarocladium oryzae* in sheath rot-infected grains of rice. **Letters in applied microbiology**, v. 34, n. 6, p. 398-401, 2002.
- GNANAMANICKAM, S. S.; MEW, T. W. Interactions between *Sarocladium oryzae* and stem attacking fungal pathogens of rice. **Plant and soil**, v. 138, n. 2, p. 213-219, 1991.
- GUARRO, J.; GAMS, W.; PUJOL, I.; GENÉ, J. *Acremonium* species: new emerging fungal opportunists—in vitro antifungal susceptibilities and review. **Clinical infectious diseases**, v. 25, n. 5, p. 1222-1229, 1997.
- GUARRO, J.; DEL PALACIO, A.; GENÉ, J.; CANO, J.; GONZÁLEZ, C. G. A case of colonization of a prosthetic mitral valve by *Acremonium strictum*. **Revista iberoamericana de micología**, v. 26, n. 2, p. 146-148, 2009.
- HIROOKA, Y.; KOBAYASHI, T.; ONO, T.; ROSSMAN, A. Y.; CHAVERRI, P. *Verrucostoma*, a new genus in the *Bionectriaceae* from the Bonin Islands, Japan. **Mycologia**, v. 102, n. 2, p. 418-429, 2010.
- HITOTO, H.; PIHET, M.; WEIL, B.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. P.; RACHIERU-SOURISSEAU, P. *Acremonium strictum* fungaemia in a paediatric immunocompromised patient: diagnosis and treatment difficulties. **Mycopathologia**, v. 170, n. 3, p. 161-164, 2010.
- KELEMU, S.; WHITE, J. F.; RAO, I. M. The role of endophytic fungi in *Brachiaria*, a tropical forage grass. **Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)**, 2001.
- KELEMU, S. et al. An endophyte of the tropical forage grass *Brachiaria brizantha*: Isolating, identifying, and characterizing the fungus, and determining its antimycotic properties. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 55-62, 2001.
- KHAN, Z.; AL-OBAID, K.; AHMAD, S.; GHANI, A. A.; JOSEPH, L.; CHANDY, R. *Acremonium kiliense*: reappraisal of its clinical significance. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2342-2347, 2011.
- KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite—what decides?. **Current opinion in plant biology**, v. 9, n. 4, p. 358-363, 2006.
- LI, W. C. ZHOU, J.; GUO, S. Y.; GUO, L. D. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. **Fungal Divers**, v. 25, p. 69-80, 2007.
- MAIA, N. C. Fungal endophytes of *Panicum maximum* and *Pennisetum purpureum*: isolation, identification and antifungal potential. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal de Lavras, 2015.

- MÜLLER, C. B.; KRAUSS, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current opinion in plant biology**, v. 8, n. 4, p. 450-456, 2005.
- ONIONS A. H. S., BARRON G. L. Monophialidic species of Paecilomyces. **Mycological Papers** 107: 1–26. 1967.
- PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 62-77, 2002.
- PETRINI. O. Fungal endophytes of tree leaves. Microbial ecology of leaves. **Microbial ecology of leaves**. Springer Verlag, New York, NY p. 179-197, 1991.
- RACEDO, J.; SALAZAR, S. M.; CASTAGNARO, A. P.; RICCI, J. D. A strawberry disease caused by *Acremonium strictum*. **European journal of plant pathology**, v. 137, n. 4, p. 649-654, 2013.
- RODRIGUES, K.F.; DIAS FILHO, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, p.905 - 909, 1996.
- RODRIGUEZ, R.J.; HENSON, J.; VAN VOLKENBURGH, E.; HOY, M.; WRIGHT, L.; BECKWITH, F.; KIM, Y.; REDMAN, R.S. Stress tolerance in plants via habitat adapted symbiosis. **International Society of Microbial Ecology**, v. 2, p. 404 - 416, 2008.
- RODRIGUEZ, R.J.; JÚNIOR, J.F.W.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v.182, n. 2, p. 314-330, 2009.
- SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 1, p. 319-343, 1998.
- SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 315-340, 2004.
- SOUZA, M. L. Utilização de microrganismos na agricultura. Biotecnologia. **Biotec Ciência e Desenvol**, v. 21, p. 28-31, 2001.
- SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.
- SREENIVASAPRASAD, S.; JOHNSON, R. Major Fungal Diseases of Rice: recent advances. **Springer Science & Business Media**, 2013.
- STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v.5, p.535-544, 2003.

SUMMERBELL, R.C.; GUEIDAN, C.; SCHROERS, H.J.; HOOG, G.S.; STARINK, M.; AROCHA ROSETE, Y.; GUARRO, J.; SCOTT, J.A. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. **Studies in Mycology**, v. 68, p. 139 – 162, 2011.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2016.

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

TSCHEN, J. S. M. CHEN, L. L.; HSIEH, S. T.; WU, T. S. Isolation and phytotoxic effects of helvolic acid from plant pathogenic fungus *Sarocladium oryzae*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 38, 1997.

VERZIGNASSI, J. R.; HOMECHIN, M.; VIDA, J. B. Microrganismos endofíticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 93-98, 1996.

WEBBER, J. A natural control of Dutch elm disease. **Nature**, v. 292, p. 449 - 451, 1981.

WICKLOW, D.T.; ROTH, S.; DEYRUP, S.T.; GLOER, J.B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycological Research**, v. 109, p.610 - 618, 2005.

WICKLOW, D.T.; POLING, S.M. Antimicrobial Activity of Pyrrocidines from *Acremonium zeae* Against Endophytes and Pathogens of Maize. **Biological Control**, v. 99, p. 109 - 115, 2009.

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.