



DANIELLY DE SOUZA GAMA

**FUNGOS ENDOFÍTICOS EM *BRACHIARIA* E
*CYNODON***

LAVRAS – MG

2014

DANIELLY DE SOUZA GAMA

FUNGOS ENDOFÍTICOS EM *BRACHIARIA* E *CYNODON*

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 a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Patrícia Gomes Cardoso

Coorientador

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros

LAVRAS

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Gama, Danielly de Souza.

Fungos endofíticos em *Brachiaria* e *Cynodon* / Danielly de
Souza Gama. – Lavras : UFLA, 2014.

90 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Patrícia Gomes Cardoso.

Bibliografia.

1. Controle biológico. 2. Pastagens. 3. Fitopatógenos. 4.
Microrganismos endofíticos. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 632.96

DANIELLY DE SOUZA GAMA

FUNGOS ENDOFÍTICOS EM *BRACHIARIA* E *CYNODON*

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 a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de junho de 2014.

Dr. Flávio Rodrigo Gandolfi Benites	EMBRAPA
Dra. Carla Luiza da Silva Ávila	UFLA
Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros	UFLA

Orientadora
Dra. Patrícia Gomes Cardoso

LAVRAS
2014

Á minha Vó Celina (in memorian) pelo exemplo de mulher e pessoa.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força para chegar até o final do mestrado com muita calma e tranquilidade.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Microbiologia Agrícola pela oportunidade de cursar o mestrado, como também a CAPES pela concessão da bolsa de estudo. A minha orientadora Patrícia Gomes Cardoso, pelo aprendizado, respeito e carinho em todos os momentos. Ao professor Flávio Medeiros do Departamento de Fitopatologia pela disponibilidade e paciência. Ao Dr. Lucas Abreu pelo auxílio que foi fundamental, muito obrigada! Aos Pesquisadores Flávio e Fausto da Embrapa Gado de Leite por estar sempre à disposição. Ao professor Paulo Pompeu do departamento de Ecologia pela disponibilidade e auxílio.

Aos amigos do Laboratório BIOGEN, Patrícia, Mônica, Natália e Mateus, pelo companheirismo, amizade e momentos bons vividos. As minhas amigas de departamento pela grande amizade formada nesses poucos anos de convivência, Luciana, Andréa, Patrícia, Monique, Sirlei, Juliana, Kaliane, Carol, Mari Coelho e Mari Lino. Em especial a minha amiga/irmã Natálie, que sempre esteve do meu lado nos momentos difíceis e alegres.

A minha amiga e companheira Sandrinha, que morou comigo esses dois anos de mestrado, sempre me aconselhando e me dando força nas horas que precisei. Cintia e Ale pelo pouco tempo de convívio, mas que parecia que nos conhecíamos há anos, obrigada meninas!

Aos meus pais José Miguel e Suely, meus irmão Pablo e Michael, as minhas cunhadas Natália e Roberta e meus sobrinhos Maria Júlia e Gustavo pelo carinho, amor, paciência e compreensão nos momentos em que não estive presente.

RESUMO

Microrganismos endofíticos habitam o interior das plantas sem causar prejuízos à planta hospedeira. As interações dos endofíticos com suas plantas hospedeiras têm se mostrado muito benéficas e podem estar relacionadas à sanidade vegetal, atuando no controle do crescimento de microrganismos patogênicos, insetos e nematoides, além de outras ações. O objetivo deste estudo foi isolar fungos endofíticos de diferentes espécies de *Brachiaria* e *Cynodon*, bem como avaliar seu potencial antifúngico contra fungos fitopatogênicos. As amostras de *Brachiaria* foram coletadas em áreas de pastagens, campos experimentais e casa de vegetação, e de *Cynodon* em casa de vegetação. Os fungos foram isolados do caule das plantas. Para a desinfestação foi utilizada água destilada estéril, etanol 96% e hipoclorito de sódio (5%). Fragmentos do colmo foram organizados em placa de Petri contendo BDA/cefotaxima e incubados a 25°C. Foram isolados 84 cepas de fungos endofíticos de *Brachiaria* e 24 de *Cynodon*. Os fungos isolados pertencem ao filo *Ascomycota* e o gênero *Brachiaria* possui 2 representantes de *Basidiomycota*. Os gêneros/espécies que tiveram maior número de isolados em *Brachiaria* foram *Paraconiothyrium*, *Phoma sorghina*, *Plenodomus* e *Sarocladium strictum*, e em *Cynodon* foram *Neosetophoma* e *Sarocladium spinificis*. Dos fungos isolados de *Brachiaria*, 10 mostraram ação antifúngica contra *Sclerotinia sclerotiorum*, sendo 4 pertencente ao gênero *Paraconiothyrium* sp., 1 *Sarocladium kiliense*, 1 *Cladosporium flabelliforme*, 1 *Acremonium curvulum*, 1 *Dissoconium* sp., 1 *Setophoma terrestris* e 1 não identificado. Em *Cynodon* 9 mostraram ação antifúngica, sendo 7 *Sarocladium spinificis*, 1 *Sarocladium* sp. e 1 não identificado.

Palavras-chave: Controle biológico, Pastagens, Fitopatógenos, Microrganismos endofíticos

ABSTRACT

Endophytic microorganisms inhabit the inside of the plants without causing damage to the host plant. The interactions of endophytes with their host plants have been very beneficial and may be related to plant health, acting in controlling the growth of pathogens, insects and nematodes, microorganisms, or other activities. The objective of this study was to isolate endophytic fungi of different species of *Brachiaria* and *Cynodon*, how to evaluate their antifungal potential against some phytopathogenic fungi. The fungi were isolated from the stems of plants. The samples were collected in *Brachiaria* pastures areas, experimental fields and greenhouse, and *Cynodon* in a greenhouse. For the disinfection sterile distilled water, 96% ethanol and sodium hypochlorite (5%) was used. Stem fragments were arranged in Petri dishes with PDA/cefotaxime and incubated at 25°C. Were isolated 84 endophytic fungi *Brachiaria* and 24 *Cynodon*. The isolates belong to the phylum *Ascomycota* and *Brachiaria* has 2 representatives of *Basidiomycota*. The genera/species that had a higher number of isolates in *Brachiaria* were *Paraconiothyrium*, *Phoma sorghina*, *Plenodomus* and *Sarocladium strictum*, and *Cynodon* were *Neosetophoma* and *Sarocladium spinificis*. Of fungi isolated from *Brachiaria*, 10 showed antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*, 4 belongs to *Paraconiothyrium* sp., 1 *Sarocladium kiliense*, 1 *Cladosporium flabelliforme*, 1 *Acremonium curvulum*, 1 *Dissoconium* sp., 1 *Setophoma terrestris* and 1 unidentified. In *Cynodon* 9 showed antifungal activity, with 7 *Sarocladium spinificis*, 1 *Sarocladium* sp. and 1 unidentified.

Keywords: Biological control, Pastures, Phytopathogen, Endophytic microorganisms

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEORICO.....	12
2.1	O gênero <i>Brachiaria</i>	12
2.2	O gênero <i>Cynodon</i>	13
2.3	Fungos endofíticos.....	15
2.4	Fungos endofíticos em plantas e gramíneas.....	18
2.5	Fungos fitopatogênicos.....	22
	REFERÊNCIAS.....	27
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1.....	38
	Identification and antifungal potential of endophytic fungi on <i>Brachiaria</i>	
1	INTRODUCTION.....	39
2	MATERIALS AND METHODS.....	40
2.1	Collecting samples of plants of <i>Brachiaria</i>	40
2.2	Isolation of endophytic fungi from plants of <i>Brachiaria</i>	41
2.3	Molecular identification, DNA amplification and sequencing.....	42
2.4	Antifungal activity of isolated endophytic fungi on phytopathogens.....	43
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	44
3.1	Isolation and molecular identification of endophytic fungi.....	44
3.2	Antifungal activity of endophytic fungi.....	59
4	CONCLUSION.....	63
	REFERENCES.....	64
	TERCEIRA PARTE – ARTIGO 2.....	74
	Identification and antifungal potential of endophytic fungi on <i>Cynodon</i>	
1	INTRODUCTION.....	75
2	MATERIALS AND METHODS.....	76
2.1	Samples collection of plants of <i>Cynodon</i>	76
2.2	Isolation of endophytic fungi from plants of <i>Cynodon</i>	77
2.3	Molecular identification, DNA amplification and sequencing.....	78
2.4	Antifungal activity of isolated endophytic fungi on phytopathogens.....	78

3	RESULTS AND DISCUSSION.....	79
3.1	Isolation and molecular identification of endophytic fungi.....	79
3.2	Antifungal activity of endophytic fungi.....	84
4	CONCLUSION.....	86
	REFERENCES.....	87

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos habitam o interior das plantas, sendo encontrados nas folhas, colmos e raízes, e ao contrário dos microrganismos patogênicos, não causam prejuízos à planta hospedeira. Dentre as quase 300.000 espécies de plantas que existem, cada indivíduo é hospedeiro de um ou vários microrganismos endofíticos. Muitos trabalhos têm mostrado o potencial do uso de microrganismos endofíticos como agentes no controle biológico de doenças e pragas em plantas, na indução de resistência na planta hospedeira, na promoção de crescimento vegetal, no aumento da tolerância ao estresse pela seca ou calor em gramíneas, na produção de metabólitos secundários de interesse para a saúde humana e na fitorremediação de áreas poluída.

Gramíneas infectadas por alguns fungos endofíticos são mais produtivas devido à resistência a fungos patogênicos, insetos e nematoides. No Brasil, os sistemas pecuários são caracterizados principalmente pela utilização das pastagens como principal fonte de alimento para os gados, estando distribuídas em diferentes regiões. Dentre as várias espécies de plantas forrageiras utilizadas na alimentação de animais, estão os gêneros *Brachiaria* e *Cynodon*. A *Brachiaria* é a forrageira mais utilizada no Brasil em áreas de pastagem, devido sua boa adaptabilidade aos variados tipos de solo e resistência as cigarrinha-de-pastagens. O gênero *Cynodon* apresenta vantagens como elevada produtividade e qualidade da forragem, tolerância a solos úmidos e a baixas temperaturas.

Sendo assim, trabalhos envolvendo o isolamento e caracterização de fungos endofíticos associados aos gêneros *Brachiaria* e *Cynodon* podem contribuir para seleção de fungos endofíticos que apresentem características interessantes a futuras associações com espécies destes gêneros. Outra contribuição seria a

bioprospecção de compostos produzidos por esses microrganismos que poderiam ser usados na indústria, medicina e agricultura. O presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar fungos endofíticos presentes em diferentes espécies e cultivares dos gêneros *Brachiaria* e *Cynodon*, bem como avaliar o potencial destes fungos no controle do crescimento de alguns fungos fitopatogênicos.

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 O gênero *Brachiaria*

O gênero *Brachiaria* é constituído por aproximadamente 100 espécies, que têm sua distribuição em regiões tropicais e subtropicais, principalmente no continente africano. Quatro dessas espécies *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria humidicola* e *Brachiaria ruziziensis* são utilizadas como plantas forrageiras na América Tropical, principalmente no Brasil (KELLER-GREIN et al., 1996). O sucesso do cultivo de forrageiras desse gênero se deve, principalmente, a resistência as cigarrinhas-de-pastagens, sua adaptabilidade a diversos sistemas de produção e tipos de solos, com baixa e média fertilidade, várzeas inundáveis, margens de florestas pouco densas e até regiões semidesérticas (VALLE, JANK e RESENDE, 2009). Possuem metabolismo C4 que confere alta eficiência fotossintética em altas temperaturas e altas irradiações, devido à menor perda de carbono pela fotorrespiração. Possui um elevado potencial de produção de forragem e adaptação a regiões tropicais (RODRIGUES e SANTOS, 2002).

O Brasil tem aproximadamente 180 milhões de hectares de pastagens e, segundo Fonseca, Martuscello e Faria (2006), o gênero *Brachiaria* ocupa cerca de 85% dessa área (MARTUSCELLO, et al., 2009). A dieta de rebanhos bovinos no Brasil depende quase exclusivamente de forrageiras tropicais, a qual é a principal fonte de energia e nutrientes. A qualidade da forragem é o fator mais importante entre os que influenciam a produtividade dos gados, seja pelo pastejo ou em confinamento (REIS et al., 2009).

A espécie *B. decumbens* é uma das forrageiras mais utilizadas no Brasil Central, apresentando boa adaptação a solos ácidos, uma vez que tem alta tolerância ao alumínio e baixa exigência de fósforo e cálcio. Entre suas

características agronômicas favoráveis, destaca-se a tolerância a solos de baixa fertilidade. A utilização desta gramínea resultou em um grande impulso na exploração da pecuária de corte e de leite no Brasil e ampliou consideravelmente a fronteira agrícola (BOMFIM et al., 2003). A *B. brizantha* difere das outras espécies em relação ao seu hábito de crescimento que é ereto e semi-ereto, sua forma de propagação que é por meio de sementes, indicada para sistemas silvipastoris e possui resistência as cigarrinhas-das-pastagens, principalmente a cultivar Marandu (ALVIM, BOTREL e XAVIER, 2002). As espécies *B. decumbens* e *B. brizantha* são predominantemente tetraploides ($2n=4x=36$) e apomíticas, ou seja, a formação do embrião ocorre sem a fusão dos gametas masculino e feminino. Assim, a descendência contém exatamente a constituição genética da planta-mãe (ASSIS et al., 2003).

A *B. humidicola* é uma das poucas espécies forrageiras que se adaptam bem a solos mal drenados sujeitos a inundações e de menor fertilidade, sendo usado em condições ambientais dos campos de cerrado da Região Norte do Brasil. A *B. riziensis* é a única espécie diplóide e sexuada, como melhor aceitação pelos gados, certamente pelo seu maior valor nutritivo. A alta susceptibilidade às cigarrinhas-de-pastagens e menor produtividade na época da seca, são fatores limitantes no uso dessa forrageira (ALVIM, BOTREL e XAVIER, 2002).

2.2 O gênero *Cynodon*

O gênero *Cynodon* compreende espécies e subespécies diploides e poliploides que pertencem à subfamília Chloridoideae da família Poaceae (PETERSON, ROMASCHENKO e JOHNSON, 2010; WU, 2011). Na década de 1970, Clayton e Harlan elaboraram uma chave para identificação das espécies africanas tropicais de *Cynodon*, usando a presença de rizomas como principal

característica de diferenciação entre *C. dactylon*, (gramas ou capim Bermuda com rizomas) e *C. nlemfuensis*, *C. plectostachyus* e *C. aethiopicus* (gramas ou capim Estrela, sem rizomas), enfatizando que dentro de *C. dactylon* existe ainda grande variabilidade (FONSECA e MARTUSCELLO, 2010).

As cultivares de Grama Estrela e Grama Bermuda cultivadas no Brasil foram desenvolvidas e avaliadas em sua maioria nos Estados Unidos, sendo elas: *C. dactylon* (Gramas Bermudas: Tifton 44, Tifton 78, Tifton 85, Coastcross e Florakirk) e *C. nlemfuensis* (Porto Rico, Branca, Roxa, Florona, Florico). A Grama Estrela Roxa (*C. nlemfuensis*) é muito cultivada no país, tendo sido introduzida no Brasil sem passar por avaliação ou seleção. As cultivares citadas, não foram desenvolvidas para condições edafoclimáticas brasileiras e não há registros oficiais que comprovem a introdução da espécie no Brasil, tendo ocorrido possivelmente pela curiosidade de alguns pecuaristas (VILELA, ALVIM e CAMPOS, 1996).

Logo após o lançamento da cultivar Coastal, novos híbridos foram desenvolvidos pelo Dr. G.W. Burton em Tifton na Universidade da Geórgia, USA, as cultivares Tifton 44, Costacross, Suwannee, Tifton 78 e Tifton 85. Todas as cultivares citadas anteriormente são Gramas Bermudas. A Universidade da Flórida lançou a variedade de Grama Estrela Florico e Florona (PEDREIRA, 2005). A Grama Estrela Roxa (*C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis*) é cultivada em muitas propriedades produtoras de leite no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. É uma espécie pouco estudada e plantada em área relativamente restrita se comparada com as cultivares de gramíneas dos gêneros *Brachiaria*, *Panicum* e *Pennisetum*, ou mesmo com outras cultivares do gênero *Cynodon*, como as Gramas Bermudas Coastcross e Tifton 85 (ANDRADE et al., 2009). A cultivar Jiggs (*C. dactylon*) é uma das mais recentes cultivares de *Cynodon* introduzidas no Brasil. É resultado de seleção de grama Bermuda por um fazendeiro do leste do Texas. Essa cultivar tem elevada capacidade de

suportem períodos de estiagem prolongados e apresenta crescimento superior a demais cultivares de grama Bermuda durante esses períodos (ATHAYDE et al.(sd)). A cultivar G.E Porto Rico (*Cynodon nlenfuensis*) é bastante tolerante a seca, produzindo por mais tempo durante o período desfavorável do ano, e adaptando-se a vários tipos de solo (BOTREL, 1983).

2.3 Fungos endofíticos

O termo endofítico foi primeiramente introduzido por De Bary (1866) sendo aplicado a qualquer microrganismo presente dentro do tecido das plantas. Uma definição proposta por Azevedo e Araújo (2007) define endofíticos como microrganismos que podem ou não crescer em meios de cultura e habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízo ao seu hospedeiro, além de não produzirem estruturas externas emergindo dos vegetais. Os fungos endofíticos têm sido isolados de diferentes espécies vegetais, árvores, palmáceas, gramíneas e líquens (FROHLICH et al., 2000; ARNOLD e LUTZONI, 2007; LI et al., 2007; MULLER e KRAUSS, 2005). A diversidade de espécies isoladas de um mesmo hospedeiro varia significativamente e essa variação pode ocorrer devido aos diferentes métodos de isolamento utilizados em cada estudo (HYDE e SOYTONG, 2008). A maioria dos endofíticos é transmitida horizontalmente por esporos de planta para planta, ou verticalmente através das sementes da planta infectada. A transmissão horizontal parece ser o mecanismo predominante de dispersão entre as espécies de endofíticos. No estudo com a planta *Theobroma cacao* foi observado que as sementes e mudas são praticamente livres de endofíticos, e a incidência de fungos endofíticos aumenta com o envelhecimento das folhas e sementes (ARNOLD et al., 2003).

A classificação dos microrganismos endofíticos descrita por RODRIGUEZ et al. (2008) agrupa os endofíticos em relação a função e local

onde foram isolados do material vegetal, sendo agrupados em quatro classes: Classe 1) frequentemente aumentam a biomassa vegetal, conferem tolerância à seca, produzem produtos químicos que são tóxicos para animais e diminuem a herbivoria; Classe 2) podem crescer acima do solo e abaixo dos tecidos, podem conferir tolerância específica ao estresse no habitat do hospedeiro; Classe 3) ocorrem principalmente em tecidos acima do solo e podem ser transmitidos horizontalmente. Podem estar associados às folhas de árvores tropicais e diversos tecidos acima do solo das plantas não vasculares, plantas vasculares sem sementes, coníferas e angiospermas lenhosas e herbáceas, flores e frutos além da ocorrência dentro dos tecidos fotossintetizantes; Classe 4) pouco é conhecido sobre os microrganismos que constituem esta classe. Estes endofíticos podem produzir compostos biotivos naturais, semelhantes aos compostos produzidos pela planta hospedeira. Esta classificação foi baseada nos isolados de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Tiger-Like), e as gramíneas *Dichanthelium lanuginosum* e *Leymus mollis*.

Entre os microrganismos endofíticos, os fungos filamentosos são os mais comumente isolados (GUNATILAKA, 2006). Em geral, não produzem sintomas aparentes de doenças, desempenhando diferentes interações, podendo estar latentes ou serem assintomáticos, sendo as interações conhecidas como neutras (SCHULZ e BOYLE, 2005; STROBEL e DAISY, 2003, AZEVEDO et al., 2002). A teoria da associação benéfica ou neutra entre microrganismos teve início com o trabalho de Perotti (1926). Na maioria dos casos estudados estas interações 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 (VARMA, SUDHA e FRANKEN, 1999; PEIXOTO NETO, AZEVEDO e ARAÚJO, 2002).

Os fungos endofíticos habitam folhas, pecíolos, estruturas reprodutivas, galhos, cascas e também raízes de plantas (FAETH e FAGAN, 2002; RODRIGUEZ et al., 2009). A maioria desses fungos pertence ao Filo *Ascomycota* e seus anamorfos, sendo que em apenas alguns trabalhos foi demonstrada a presença de representantes no Filo *Basidiomycota* (ARNOLD e LUTZONI, 2007; HYDE e SOYTONG, 2008; RUNGJINDAMAI et al., 2008).

Estes microrganismos constituem um grupo ainda pouco estudado de organismos produtores de metabólitos secundários com potencial para serem empregados na medicina, na agricultura e na indústria (STROBEL e DAISY, 2003; GUO et al., 2008). Nos anos 90, estudos realizados despertaram ainda mais o interesse biotecnológico para o imenso potencial dos microrganismos endofíticos. Foi identificado o fungo endofítico *Taxomyces andreanae* encontrado no interior da planta *Taxus brevifolia* capaz de produzir o taxol que é um antitumoral de alto valor no mercado internacional (STIERLE, STROBEL e STIERLE, 1993). Até 1998 mais de 30 fungos que produzem taxol foram relatados globalmente. A maioria deles são endofíticos de *Taxus* spp. pertencentes a ascomicetos e fungos imperfeitos (SURYANARAYANAN, KUMARESAN e JOHNSON, 1998). Como há um grande número de fungos que produzem taxol, é sugerido que o reino dos fungos é uma mina de ouro de taxol. Se algum dos isolados microbianos puder fornecer quantidades razoáveis e confiáveis detaxol, mais drogas estarão disponíveis para estudos e tratamentos, a um custo menor para paciente e sem nenhum custo para o meio ambiente (GANGADEVI e MUTHUMARY, 2008).

Durante os últimos 20 anos, tem-se observado um aumento no número de metabólitos secundários novos produzidos por microrganismos. Os endofíticos são metabolicamente mais ativos do que os seus homólogos livres, devido às suas funções específicas na natureza e na ativação de diversas vias metabólicas para sobreviver nos tecidos do hospedeiro (STROBEL e DAISY

2003; STROBEL, 2006; RIYAZ-UL-HASSAN et al., 2012; PORRAS-ALFARO e BAYMAN, 2011). Os produtos naturais produzidos por esses microrganismos estão sendo avaliados visando atender às crescentes necessidades por novas drogas, agentes quimoterápicos e produtos agroindustriais que sejam, ao mesmo tempo, mais efetivos, menos tóxicos e que apresentem menor impacto ambiental (STROBEL et al., 2004).

Os metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular produzidos pelo microrganismo em resposta às condições ambientais. Acredita-se que esses metabólitos não sejam essenciais ao crescimento do microrganismo, mas que estejam envolvidos em processos de comunicação entre microrganismo e planta hospedeira. São compostos extremamente diversos, com bioquímica única (BÉRDY, 2005). Os metabólitos secundários já isolados de extratos de fungos endofíticos pertencem a diversos grupos estruturais, sendo os principais: esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, derivados perilenos, quinonas, furandionas, terpenoides, depsipeptídeos e citocalasinas (NEWMAN e CRAGG, 2012).

2.4 Fungos endofíticos em plantas e gramíneas

Muitas espécies de fungos endofíticos são encontradas nas plantas e gramíneas. Esses fungos estão presentes no interior das folhas, colmos e órgãos reprodutivos das plantas hospedeiras. 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. Quatro anos mais tarde, Claydon, Grove e Pople (1985) comprovaram que o efeito no inseto-praga era um

composto tóxico produzido pelo fungo endofítico, que também mostraram que endofíticos da família *Xylariaceae* são produtores de metabólitos secundários que afeta larvas de besouro, em hospedeiros vegetais do gênero *Fagus*. Na gramínea *Festuca*, a presença do fungo endofítico *Acremonium* sp. reduziu o ataque dos insetos *Spodoptera frugiperda* e *S. eridana* (BREEN, 1993). O extrato do fungo endofítico *Muscodora vitigenus*, isolado da planta *Paullinia paullinoides* forneceu um novo diterpeno, o ácido nodulispórico que apresentou potente propriedade inseticida contra larvas de moscas (DAISY et al., 2002). Diversas cultivares de gramas infectadas por *Epichloë* e *Neotyphodium* endofíticos são comercialmente disponíveis. A transmissão vertical eficiente destes endofíticos tem permitido a produção de sementes infectadas a uma escala comercial. Cultivares infectadas com *Neotyphodium* e *Epichloë* mostrou um aumento da 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).

Plantas de *Festuca arundinacea* e *Lolium perenne* nas quais os fungos endofíticos estão presentes podem produzir mais inflorescências e sementes do que plantas em que não há presença de fungos endofíticos em seu interior, refletindo maior vigor de germinação (CLAY, 1987; CLAY, 1990). Sementes de *Festuca arundinaceae* e *Lolium perenne* germinam mais rapidamente quando estão associadas a fungos endofíticos, como mudas com colonização de endofíticos crescem mais rápido do que mudas sem endofíticos (CLAY, 1987; CHEPLICK, CLAY e WRAY, 1989). Em um caso relatado em uma cultura de milho com dois endofíticos sendo *Chaetomium* e *Phoma*, quando estes fungos foram previamente inoculados em plantas, houve redução da gravidade da doença foliar causada por *Puccinia* e *Pyrenophora* spp. O mesmo efeito protetor foi observado quando o filtrado da cultura dos endofíticos foi aplicado às plantas (DINGLE e MCGEE, 2003; ISTIFADAH e MCGEE, 2006).

Um estudo realizado nas savanas da Colômbia mostrou que duas espécies endofíticas isoladas de *Aiphanes bicornis* e *Pseudobombax campestre* foram identificadas como espécies de *Balansia*. Este foi o primeiro relato de *Balansia* spp. em *A. bicornis* e *P. campestre* nas savanas da Colômbia. (KOGA et al., 1995). Foi realizado um levantamento de fungos endofíticos em duas espécies de *Brachiaria* em pastagens no estado do Pará, nas quais várias espécies endofíticas foram isoladas das 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. (RODRIGUES e DIAS, 1996).

Foi relato por Kelemu, White e Rao (2000) que, em níveis moderados de estresse, a presença de *Acremonium implicatum* não tem efeito significativo sobre as características de crescimento dos ramos de *B. arrecta* CIAT 16845, mas, sob estresse hídrico severo, plantas infectadas com endofítico mantêm melhor expansão foliar e produz significativamente mais biomassa foliar do que as plantas sem endofíticos. *A. implicatum* foi isolado de *B. brizantha*, *B. decumbens* CIAT 606 e *B. arrecta* CIAT 16845. Análise molecular, usando sequências da região ITS do rDNA, confirmou que os isolados pertenciam ao gênero *Acremonium* e estavam próximos das espécies de *Acremonium strictum* e *Acremonium kiliense*. Na inibição *in vivo*, utilizando o fungo endofítico *A. implicatum* frente ao fungo patogênico *Drechslera* sp., metade de um grupo de clones geneticamente idênticos da gramínea foi tratado com o fungicida Folicur® (tebuconazole) para gerar plantas livres de endofíticos, a outra metade ficou sem tratamento. Todo o grupo de clones foi desafiado com *Drechslera* sp. Plantas infectadas com endofíticos manifestou melhor resistência à *Drechslera* sp., com lesões foliares menores e mais pontuais e reduziu significativamente a esporulação fúngica (KELEMU et al., 2001).

Com a redução dos sintomas da doença, Kelemu et al. (2003) desenharam um par de *primers* específico para a detecção rápida e confiável de *A. implicatum* em tecidos da *Brachiaria*. Foi observado que o fungo *A. implicatum* se concentrava nas bainhas. Foi avaliado também utilizando estes *primers* o mecanismo de transmissão de *A. implicatum* pela semente de *Brachiaria*. Foram obtidas sementes provenientes de plantas infectadas naturalmente, outras foram obtidas de plantas livres de endofíticos, e outras sementes obtidas de plantas inoculadas artificialmente através do meristema apical da planta. Posteriormente essas sementes foram plantadas para sua germinação. Foi observada morte em parte das plantas infectadas artificialmente. Isso pode ter sido resultado de danos causados ao meristema apical durante a infecção. Entre as plantas que sobreviveram, o fungo foi detectado em apenas 7% das plantas. Nenhum produto de amplificação foi detectado nas plantas provenientes das sementes livres de endofíticos. Já nas plantas obtidas das sementes infectadas naturalmente pelo *A. implicatum*, todas apresentaram produto de amplificação confirmando a presença deste fungo nas plantas (DONGYI e KELEMU, 2004).

O fungo endofítico *Acremonium zae* encontrado nos grãos de milho (*Zea mays*) apresentou forte atividade antifúngica ao crescimento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*, ambos causadores do apodrecimento dos grãos e produtores de 11 micotoxinas, entre elas aflotoxina e fumonisina. Foi verificado que a atividade antifúngica deste endofítico deve-se a produção de dois novos antibióticos derivados de policetídeo, pirrocininas A e B, as quais também foram ativos contra *Candida albicans* e bactérias Gram-positivas, incluindo estirpes multiresistentes a antibióticos (WICKLOW et al., 2005; WICKLOW e POLING, 2009).

Grande versatilidade na produção de metabólitos foi observada para o fungo *Aspergillus fumigatus* isolado das folhas da forrageira *Cynodon dactylon*.

Este produziu dois novos metabólitos, asperfumoide e asperfumina, e outros compostos, fumigaclavina C, fumitremorgina C, fisciona e ácido helvólico, os quais inibiram o crescimento de *C. albicans* (LIU et al., 2004).

2.5 Fungos fitopatogênicos

Alguns fungos fitopatogênicos podem ser usados no estudo *in vitro* para avaliar o potencial de inibição do crescimento destes pelos fungos endofíticos. Um exemplo seria o fungo *Fusarium verticillioides*, que causa várias doenças em grãos como podridão radicular, morte de plântulas, podridão de espiga, podridão de colmo (MUNKVOLD, 2003). Esse fitopatógeno é o principal responsável pela produção de micotoxinas em grãos de milho e nos subprodutos oriundos desse cereal, destacando-se aquelas do grupo das fumonisinas (WORDELL FILHO, 2010), que causam a síndrome do edema pulmonar, diminuição do consumo de alimentos e diarreia em suínos, inibição do crescimento e mortalidade em aves (GIL e LIMA, 1996). No Brasil, é de ocorrência comum e frequente em sementes e grãos de milho produzido em todas as regiões (RIBEIRO et al., 2005; NERBASS et al., 2008).

Sabe-se que *Fusarium verticillioides* tem a capacidade de transmitir-se para as espigas de forma sistêmica, à partir de sementes (WILKE et al., 2007). Esse fungo é responsável por aproximadamente 60% das podridões-de-colmo diagnosticadas pelo Laboratório de Fitossanidade da Epagri/Cepaf, Chapecó, SC, além de estar presente na totalidade das patologias de sementes realizadas nos últimos anos, nesse mesmo local (WORDELL FILHO, 2010). O fungo *F. verticillioides* também provoca a morte de plântulas, causando necrose no coleótilo, que assume colorações variando da branca-rosada à rosa-salmão. A ocorrência dessa doença em plântulas de milho vem aumentando nos últimos anos, especialmente nas áreas conduzidas pelo sistema de semeadura direta e nos

locais onde a semeadura é realizada em períodos frios e com solo úmido. Esse ambiente favorece a incidência desse fitopatógeno nas sementes e em plântulas, principalmente quando os cultivos são conduzidos em solos argilosos, compactados e com palhada ou resíduos vegetais. Falta de rotação de culturas, antecipação da semeadura, criam ambientes que aumentam os riscos da ocorrência dessa doença (WORDELL FILHO e CASA, 2010). Além do milho, o arroz (*Oryza sativa* L.), a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e o sorgo *Sorghum bicolor* (L.) são hospedeiros de *F. verticillioides* (TARR, 1962).

Sclerotinia sclerotiorum também é um fitopatógeno de importância mundial por ocorrer tanto em regiões temperadas quanto subtropicais ou tropicais, além de ser um fungo polífago, abrangendo 408 espécies e 278 gêneros de plantas hospedeiras (BOLTON, THOMMA e NELSON, 2006). O mofo-branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é uma das doenças mais destrutivas do feijoeiro e bastante dependente de condições climáticas favoráveis, ocorrendo principalmente em altitudes acima de 600 metros, com condições climáticas ideais, temperaturas amenas, alta umidade do solo e do ar (ALMEIDA e SEIXAS, 2010). Os primeiros relatos da ocorrência de mofo-branco no Brasil foram em 1921, em plantas de batata no Estado de São Paulo. Posteriormente, de 1921 a 1976, foram relatadas diversas ocorrências em hortaliças, sendo, em soja, o primeiro relato, em 1976, adquirindo importância no Centro-Sul do Paraná por ser uma região tradicionalmente produtora e exportadora de sementes para outras regiões (JACOUD FILHO, 2010).

Para o feijão, também é uma das doenças mais destrutivas da cultura no mundo. Nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, a doença manifesta-se com maior intensidade na safra de outono-inverno. Nessa época, a baixa evapotranspiração e a alta umidade do solo proporcionada pela irrigação favorecem a doença, que geralmente é pouco prejudicial nas épocas tradicionais de cultivo, no cultivo das “águas” (de agosto a novembro) e no cultivo das

“secas” (de janeiro a março). A doença torna-se ainda mais prejudicial onde ocorre crescimento vegetativo abundante da cultura, pouco arejamento e penetração da luz solar, drenagem deficiente do solo e rotação inadequada de culturas (DALLA PRIA e SILVA, 2010). A doença inicia-se em reboleiras na lavoura, por ocasião do florescimento, especialmente nos locais onde há maior crescimento vegetativo e acamamento das plantas. Os sintomas são visíveis nas folhas, hastes e vagens, começando com a formação de manchas encharcadas, seguida por crescimento micelial branco e cotonoso, que é característico do mofo-branco. Com o progresso da doença, as folhas murcham. Dentro e fora dos tecidos infectados são formadas partículas duras e negras, de formato irregular, facilmente visíveis a olho nu, que são os escleródios dos fungos. Os tecidos doentes tornam-se secos, leves e quebradiços, e as sementes infectadas ficam sem brilho, enrugadas e mais leves (ABREU, 2005).

Outro gênero que causa doença em culturas e pode ser alvo do controle biológico pelos fungos endofíticos é o *Colletotrichum*. Algumas espécies são responsáveis por várias doenças em diversas culturas de importância econômica. As espécies desse gênero ocorrem em várias regiões onde o cafeeiro é cultivado, apresentando diferentes graus de severidade, tanto em lavouras mal manejadas como em lavouras novas e bem conduzidas (BAILEY et al., 1992; PARADELA FILHO e PARADELA, 2001; GARRIDO et al., 2008).

C. gloeosporioides é frequentemente observado em cafeeiros associado a sintomas de necrose, mancha manteigosa em folhas e queima de folhas e ponteiros. Em mudas mantidas em viveiros muito úmidos e com sombreamento denso, o fitopatógeno causa a queima rápida dos tecidos resultando em queda da folha e morte da muda. As mudas infectadas apresentam folhas com manchas negras dispersas pelo limbo, podendo causar a queda total das folhas. No campo, este fungo pode agir como invasor secundário de lesões resultante de deficiência de potássio, caracterizada pela queima do ápice da folha. O fungo, ao penetrar

nos tecidos, aumenta a área necrosada. Quando há deficiência no balanceamento do suprimento de cálcio e magnésio, o fungo causa lesões negras encharcadas semelhantes às causadas por bactérias. O fitopatógeno pode infectar a base do pedúnculo da inflorescência e causar a queima das espigas. Em plantas adultas, os sintomas surgem durante a estação seca, na época da maturação dos frutos. A translocação de potássio para formação dos frutos resulta na queima do ápice foliar por onde o fungo penetra, queimando áreas maiores da folha. O fungo sobrevive como saprófita em folhas e ramos infectados ou em outros hospedeiros da vegetação espontânea (FERREIRA et al., 2009a; FERREIRA et al., 2009b).

A mancha-parda é bastante conhecida na região sul do Brasil. É uma doença causada por fungos do gênero *Bipolaris*. Algumas espécies infectam principalmente gramíneas. Estes fungos causam danos em arroz, coqueiro, pastagens, girassol, milho, tomate, coco, lupino, pândano, confete, dália, entre tantas outras plantas. As infecções são mais acentuadas em regiões tropicais, embora estes fungos sejam cosmopolitas. As lesões causada por este fungo podem levar a manchas marrom-escuras em folhas, caules e grãos sendo mais comumente encontradas nas folhas. Estas manchas são arredondadas ou circulares, tendo o centro mais claro e acinzentado. Na região externa às manchas, caracteriza-se um halo amarelo-claro. Em casos extremos, as manchas podem cobrir até a metade da área foliar. As infecções ocorrem principalmente na germinação e no florescimento e são de difícil controle. A dispersão destes fungos ocorre prioritariamente devido à ação do vento e, em menor escala, através de sementes e mudas infectadas. Além disso, em pequenas distâncias, gotas de chuva e/ou irrigação podem servir como meio de transporte para os esporos, infectando plantas próximas ao foco inicial. As condições favoráveis ao desenvolvimento destes fungos são temperaturas amenas associadas à alta umidade relativa do ar e molhamento frequentes. Além do mais, plantas com

deficiência nutricional ou hídrica são mais propensas a ficarem doentes (GOULART, 2013).

REFERÊNCIAS

ABREU, A.F.B. **Cultivo do Feijão da Primeira e Segunda Safra na Região Sul de Minas Gerais**. Embrapa Arroz e Feijão, 2005. Sistema de Produção 6.

ALMEIDA, A.M.R.; SEIXAS, CD.S. (Ed.) **Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura**. Embrapa Soja, 2010, 399 p.

ANDRADE, C. M. S.de; ASSIS, G. M. L.de; FAZOLIN, M.;GONCALVES, R. C.; SALES, M. F. L.; VALENTIM, J. F.;ESTRELA, J. L. V. **Gramma-estrela-roxa: gramínea forrageira para diversificação de pastagens no Acre**. Embrapa Acre, 2009, 83 p.

ARNOLD, A.E.; MEJIA, 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.

ASSIS G. M. L.; EUCLYDES R. F.; CRUZ C. D.; VALLE C. B. Discriminação de espécies de *Brachiaria* baseada em diferentes grupos de caracteres Morfológicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 576 - 584, 2003.

ATHAYDE, A.A.R.; CARVALHO, R.C.R.; MEDEIROS,L.T.; VALERIANO, A.R.; ROCHA, G.P. Gramineas do genero *Cynodon*-cultivares recentes no Brasil. **Boletim técnico**, n.73, p 1-14, sd.

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

AZEVEDO, J.L.; JR MACCHERONI, W.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. *In*: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. de; AZEVEDO, J.L. **Biotechnologia**: avanços na agricultura e na agroindústria. EDUCS, 2002, p.131-163.

BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R. J.; PRING, R. J.; NASH, H. C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. *In*: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford: CAB International, 1992, p. 88 - 120.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 1 - 26, 2005.

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v.7, n.1, p.1 -16, 2006.

BOMFIM, E. R. P.; PINTO, J. C.; SALVADOR, N.; MORAIS, A. R.; ANDRADE, I. F.; ALMEIDA, O. C. Efeito do tratamento físico associado à adubação em pastagem degradada de braquiária, nos teores de proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras. v.27, n.4, p.912 - 920, 2003.

BOTREL, M. A. Algumas considerações sobre gramíneas e leguminosas forrageiras. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1983. 59 p. (Embrapa-CNPGL.Documentos, 9).

BREEN, J.P. Enhanced to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in *Acremonium* endophyte-infected turfgrasses. **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 621- 629, 1993.

BRILMAN, L.A. Endophytes in turfgrass cultivars. *In*: ROBERTS, C.A.; WEST, C.P.; SPIERS, D.E. **Neotyphodium in cool season 18 grasses**. Blackwell publishing, 2005, v. 19, p. 341- 349.

CHEPLICK, G.P.; CLAY, K.; WRAY, S. Interactions between fungal endophyte infection and nutrient limitation in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. **New Phytologist**, v. 111, n. 1, p. 89 - 97, 1989.

CLAYDON, N.; GROVE, J.F.; POPLE, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 937- 943, 1985.

CLAY, K. Comparative demography of three graminoids infected by systemic, clavicipitaceous fungi. **Ecology**, v. 71, n. 2, p. 558 - 570, 1990.

CLAY, K. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. **Oecologia**, v. 73, p. 358 - 362, 1987.

DAISY, B.; STROBEL, G.; EZRA, D.; CASTILLO, U.; BAIRD, G.; HESS, W.M. *Muscodor vitigenus* anam. sp. nov., an endophyte from *Paullinia paullinioides*. **Mycotaxon**, v. 84, p. 39 - 50, 2002.

DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C. **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa. UEPG, 2010.

DE BARY, A. Morphologie Physiologie der Pilze. Flechten, und Myxomyceten. Leipzig: W. Engelmann, 1866, 316 p. Handbuch der Physiologischen Botanik.

DINGLE J.; MCGEE P.A. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of 2 *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* in wheat. **Mycological Research**, v. 107, p. 310 - 316, 2003.

DONGYI, H.; KELEMU, S. ***Acremonium implicatum*, a Seed-Transmitted Endophytic Fungus in *Brachiaria* Grasses**. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2004.

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.

FERREIRA, J. B.L.; ABREU, M. S.; PEREIRA, R. B.; ALVES, E.; PEREIRA, I. S. Aspectos morfológicos da colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em órgãos de plantas de cafeeiros com sintomas de mancha manteigosa. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 4, p. 956 - 964, 2009a.

FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S.; FERNANDES, K. D.; PEREIRA, R. B. Sensibilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* (Mancha manteigosa do cafeeiro) a diferentes concentrações de fungicidas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, Edição Especial, p. 2052 - 2058, 2009b.

FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. **Plantas forrageiras**. Editora UFV, 2010, v. 1, 537 p.

FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A.; FARIA, D.J.G. Adubação em gramíneas do gênero *Brachairia*: mitos e realidades In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DAS PASTAGENS, 2006, **Anais...**,2006, p. 153 - 182.

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

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. **Mycologia Balcanica**, v.5, p. 1- 4, 2008.

GARRIDO, C.; CARBÚ, M.; FERNÁNDEZ-ACERO, F. J.; BOOMHAM, M.; COLYER, A. Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. **Plant Pathology**, v.58, p.43 - 51, 2008.

GIL, L.H.V.G.; LIMA, G.J.M.M. Micotoxinas: o perigo oculto das rações. **Agropecuária Catarinense**, v.9, p.51 - 55, 1996.

GOULART, I.C.G.R. **Mancha-parda**, Jardineiro.net, 14 set. 2013. Disponível em: <<http://www.jardineiro.net/pragas/mancha-parda.html>>, Acesso em 02 de jan, 2014.

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

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.

HYDE, K.D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v.33, p. 163 - 173, 2008.

ISTIFADAH, N.; MCGEE, P.A. Endophytic *Chaetomium globosum* reduces 33 development of tan spot in wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. **Australian Plant Pathology**, v. 35, p. 411 - 418, 2006.

JACCOUD FILHO, D. S.; MANOSSO NETO, M. O.; VRISMAN, C. M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; PIERRE, M. L. C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F. F.; DEMARCH, V. B. e ROCHA, C. H. Análise, Distribuição e Quantificação do “Mofo Branco” em Diferentes Regiões Produtoras do Estado do Paraná: In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 31, 2010, **Resumos...**Embrapa Soja, 2010, p. 226 - 228.

KELEMU, S.; DONGYI, H.; GUIXIU, H.; TAKAYAMA, Y. Detecting and differentiating *Acremonium implicatum*: Developing a PCR based method for an endophytic fungus associated with the genus *Brachiaria*. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 115 - 118, 2003.

KELEMU, S.; WHITE JÚNIOR, J.F.W.; MUÑOZ.F.; TAKAYAMA, Y. An endophyte of the tropical forage grass *Brachiaria brizantha*: Isolating, identifying, and characterizing the fungus, and determining its antimycotic properties. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 47, p. 55 - 62, 2001.

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), 2000, 10 p. Disponível em: http://www.researchgate.net/publication/238621919_THE_ROLE_OF_ENDOPHYTIC_FUNGI_IN_BRACHIARIA_A_TROPICAL_FORAGE_GRASS
Acesso em: 02 Jan. 2014.

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collection. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. ***Brachiaria: biology, agronomy and improvement***. CIAT, 1996, p.16 - 35.

KOGA, H.; KELEMU S.; SÁNCHEZ S. First report of *Balansia* on *Andropogon bicornis* and *Panicum campestre* in the savannas of Colombia. **Plant Disease**, v. 79, p.1074, 1995.

LI, G.H.; YU, Z.F.; LI, X.; WANG, X.B.; ZHENG, L.J.; ZHANG, K.Q. Nematicidal metabolites produced by the endophytic fungus *Geotrichum* sp. A14. **Chemistry & Biodiversity**, v.4, n. 7, p. 1520 - 1524, 2007.

LIU, J.Y.; SONG, Y.C.; ZHANG, Z.; WANG, L.; GUO, Z.J.; ZOU, W.X.; TAN, R.X. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 114, p.279 - 287, 2004.

MARTUSCELLO, J.A.; JANK, L, GONTIJO NETO, M.M.; LAURA, V.A.; CUNHA, D.N.F.V. Produção de gramíneas do gênero *Brachiaria* sob níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. [online]. v. 38, n.7, p. 1183 - 1190, 2009.

MULLER, C.B.; KRAUSS, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, n. 4, p. 450 - 456, 2005.

MUNKVOLD, G.P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p.705 - 713, 2003.

NERBASS, F.R. et al. Sanidade de sementes de milho comercializadas na safra agrícola de 2006/07 em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.7, p.30-36, 2008. Disponível em: <http://rca.cav.udesc.br/rca_2008_1/nerbass_et_al.pdf> Acesso em: 15 set. 2012.

NEWMAN, D.J.; CRAAG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. v. 75, p. 311 – 335, 2012.

PARADELA FILHO, O.; PARADELA, A. L. O complexo *Colletotrichum* – cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Departamento de Fitopatologia, 2001, p. 269 - 275.

PEDREIRA, C.G.S. Capim do gênero *Cynodon*: histórico e potencial para a pecuária brasileira. In: VILELA, D.; RESENDE, J.C.; LIMA, J. **Cynodon: Forrageiras que estão revolucionando a pecuária brasileira**. Embrapa Gado de Leite, 2005, p. 33 - 38.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Biociência**, n. 29, p. 62 - 76, 2002.

PETERSON, P.M.; ROMASCHENKO, K.; JOHNSON, G. A classification of the Chloridoideae (Poaceae) based on multi-gene phylogenetic trees. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 580 – 598, 2010.

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

REIS, R. A.; VIEIRA, B.R.; CARVALHO, I.P.C.; CASAGRANDE, D.R. Suplementação na estação chuvosa. In: SIMPÓSIO DE PECUÁRIA DE CORTE, 6, 2009, **Anais...** SIMPEC, 2009, p. 209 - 242.

RIBEIRO, N.A. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, v.35, p.1003 - 1009, 2005.

RIYAZ-UL-HASSAN, S.; STROBEL, G.A.; BOOTH, E.; KNIGHTON, B.; FLOERCHINGER, C.; SEARS, J. Modulation of volatile organic compound formation in the Mycodiesel producing endophyte- *Hypoxylon* sp. C1-4. **Microbiology**, v. 58, p. 464 – 473, 2012.

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.

RODRIGUES, M. G.; SANTOS, A. R. Efeito da adubação com resíduo orgânico em Latossolo Amarelo Coeso na produção da *Brachiaria decumbens* stapf. e no acúmulo de metais pesados. **Magistra**, v. 14, n. 2, 2002.

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.

RUNGJINDAMAI, N.; PINRUAN, U.; CHOYKLIN, R.; HATTORI, T.; JONES, E.B.G. Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. **Fungal Diversity**, v.33, p. 133 - 161, 2008.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661 - 686, 2005.

SILVA, R. R. **Poaceae (Gramineae) da ARIE – Santuário de Vida Silvestre do Riacho Fundo**. 2010. 187 p. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade de Brasília, Brasília, DF.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, p.214 - 216, 1993.

STROBEL, G. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current Opin Microbiology**, v. 9, p. 240 – 244, 2006.

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

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

SURYANARAYANAN, T. S.; KUMARESAN, V.; JOHNSON, J. A. Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1003 - 1006, 1998.

TARR, S.A.J. **Diseases of sorghum, sudan grass and broom corn**. Kew: Common Wealth Mycological Institute, 1962, 380 p.

VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v. 56, p. 460 - 472, 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**, v. 65, p. 2741-2744, 1999.

VILELA, D.; ALVIM, M.J.; CAMPOS, O.F. Produção de leite de vacas Holandesas em confinamento ou em pastagem de coast-cross. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.25, n.6, p.1228 - 1244, 1996.

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

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.

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.

WORDELL FILHO, J.A. Micotoxinas na cultura do milho. **Agropecuária Catarinense**, v. 23, n. 2, p. 46 - 48, 2010.

WORDELL FILHO, J.A.; CASA, R.T. Doenças na cultura do milho. In: WORDELL FILHO, J.A.; ELIAS, H.T. (Org.). **A cultura do milho em Santa Catarina**. 2010, p. 207 - 273.

WILKE, A.L.; BRONSON C.R.;TOMAS, A.; MUNKVOLD, G.P. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. **Plant Disease**, v.91, p.1109-1115, 2007.

WU, Y. *Cynodon*. In: KOLE, C. (Ed.), **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Millets and Grasses**.2011, p. 53–71.

SEGUNDA PARTE– ARTIGO 1
IDENTIFICATION AND ANTIFUNGAL POTENTIAL OF
ENDOPHYTIC FUNGI ON *BRACHIARIA*

Article written according to the standards of the journal (preliminary version)

1 INTRODUCTION

Brazilian grasslands are distributed in different regions and exhibit great variation in edaphoclimatic conditions. Successful establishment of pastures in such diverse environments involves the use of tolerance mechanisms that allow them to overcome the pressures of environmental stresses and maintain production and forage quality at satisfactory levels (PEREIRA et al., 2003). The *Brachiaria* genus is one of the most important forage and used in Brazilian areas of pasture with cattle producers in feeding due to its good adaptation to different soil types, resistant to leafhoppers-to-pasture and species with low nutritional requirement (VALLE, JANK and RESENDE, 2009).

Research demonstrates association between grasses and endophytes. Asymptomatically, these fungi are present in the aerial parts, stems, reproductive organs and roots of host plants is a major route of entry there of without causing damage, and produce no external structures (AZEVEDO and ARAÚJO, 2007; STONE, BACON and WHITE, 2000; KONIG et al., 1999; ARAÚJO, 2001). Through the production of toxic alkaloids, endophytic fungi defend their host plants against herbivores and insects. They also have other applied-value properties, such as promoting growth and drought tolerance of host plants (LU et al., 2000; HALLMANN et al., 1997; SCHULZ and BOYLE, 2005). Kelemu, White and Rao (2000) observed that at moderate stress levels, the presence of *Acremonium implicatum* has no significant effect on the growth characteristics of the branches of *B. arrecta* CIAT 16845, but under severe water stress, plants infected with the endophytic, maintain better leaf expansion and produce significantly more leaf biomass than endophyte-free plants. In Brazil there is practically no work or groups involved with the isolation of endophytic fungi of this forage grass. Thus, studies involving the isolation and characterization of endophytic fungi associated with *Brachiaria* species becomes important and can

contribute to the selection of endophytic fungi that present interesting associations with species of these genera.

This study aims to isolate and identify endophytic fungi isolated from different species of the genus *Brachiaria*, as well as evaluate their antifungal potential against plant phytopathogens.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Collecting samples of plants of *Brachiaria*

Of the 39 samples of plants of different species and cultivars of *Brachiaria* obtained, 11 were from pastures, 27 experimental fields and 1 from the greenhouses. These samples were provided by professors and researchers working with these plant at the Federal University of Lavras (UFLA), Embrapa Beef Cattle-CNPGC (Campo Grande-MT), Embrapa Dairy Cattle-CNPGL (Juiz de Fora-MG) and Embrapa Eastern Amazona-CPATU (Belém-PA). The samples were collected during the rainy season and dry. Samples from UFLA were collected in August and October, Embrapa Beef Cattle in March, Embrapa Dairy Cattle in January, July and September, and Embrapa Eastern Amazon in October (Table 1).

The plant sample were free of disease symptoms and the collection was taken close to the ground (10 cm) with pruning shears/or cleaver. Subsequently were placed in plastic bags and then taken to the laboratory (BIOGEN) for the isolation of endophytic fungi.

Table 1 Origin and number of samples of species/cultivars of *Brachiaria*

Location/environment	Samples	N°
Embrapa Eastern Amazon	<i>B. brizantha</i> cv. Xaraés	2
(CPATU)/Belém - PA	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	2
- Experimental field	<i>B. brizantha</i> cv. Piatã	2
	<i>B. ruziziensis</i>	1
Embrapa Beef Cattle	<i>B. brizantha</i> cv. Xaraés	1
(CNPGC)/Campo Grande - MT	<i>B. brizantha</i> cv. Piatã	1
- Pasture	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	1
	<i>B. decumbens</i> cv. Basilisk	1
	<i>B. humidicola</i> cv. Tupi	1
	Mulato II hybrid grass	1
	<i>B. humidicola</i> cv. Llanero	1
	<i>B. humidicola</i> common	1
Federal University of Lavras	<i>B. mutica</i> Angola	1
(UFLA)/Lavras – MG	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	1
- Experimental field	<i>B. humidicola</i> common	2
	Mulato I hybrid grass	1
Embrapa Dairy Cattle	<i>B. ruziziensis</i>	15
(CNPGL)/Juiz de Fora - MG –	<i>B. decumbens</i> cv. Basilisk	2
Experimental Field, Pasture and	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	1
Greenhouses	<i>B. brizantha</i> cv. Xaraés	1

2.2 Isolation of endophytic fungi from plants of *Brachiaria*

Samples of collected grasses were washed in tap water, and then 10cm stem pieces were placed in 50mL Falcon type sterile tubes for disinfestation of epiphytic microorganisms. First, the stem pieces were placed in tubes containing

sterile distilled water (1 min), then were transferred into tubes with 96% ethanol (2 min), followed by tubes with sterile distilled water (1 min), 5% sodium hypochlorite (2min) and sterile distilled water (1 min.). An aliquot of 0,1 ml of this water was plated on a Petri plate containing PDA/cefotaxime being used as a control. Subsequently, the stem pieces were dried in sterile filter paper and cut into small pieces (0,5 cm) using sterile scalpel. Fifteen pieces of the stem were seeded into each petri dish containing PDA/Cefotaxime culture medium and stored at 25°C in BOD. Daily examination was done to assess the presence of fungal colonies and bacterial contaminants. The endphytic fungi were transferred individually to new plates containing PDA/cefotaxime medium. The entire procedure was performed in a laminar flow and surgical glove. There are changes in procedures concerning the percentage of ethanol and sodium hypochlorite and its duration, which were 70% for 2 min and 2% for 3 min, respectively; OMA medium was used without antibiotics and incubated at 28°C (adapted from KELEMU et al., 1996).

Fragments of 3-4mm from the mycelium of endophytic fungi grown on PDA were stored in sterile eppendorf containing 1mL of sterile distilled water and kept at 4°C (CASTELLANI, 1967).

2.3 Molecular identification, DNA amplification and sequencing

The molecular identification of fungal isolates was performed using sequences of ITS and 18S regions. Fungi were cultured on PDA and mycelium was scraped with a sterile toothpick. The extraction of total DNA was performed according the "Mobio" UltraClean ® Microbial -Kit amplification reactions were performed in a volume of 30 µL, containing 15µL of the Quiagen kit, 12µL H₂O, 1µL *primer* F, 1µL *primer* R, 1µL for DNA ITS and 18S regions. The amplification parameters were specific for each pair of "*primer*" used. *Primers*

used for amplification of the ITS region were ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) under the conditions of: 95°C 2min, 95°C 1min, 50°C 1 min, 72°C 1 min and 72°C 7 min, programmed for 35 cycles. *Primers* used for amplification of the 18S region were NS1(GTAGTCATATGCTTGTCTC) and NS6 (GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC) under the conditions of: 94°C 1 min, 94°C 35seg, 50seg 55°C, 72°C 2min and 72°C 6 min, programmed for 35 cycles. The amplifications were performed in a thermocycler "Programmable Thermal Controller-100 MJ Research, Inc."

The amplification product were sent to Macrogen to be purified and sequenced. The sequences were analyzed with the aid of the SeqAssem 07/2008 program and alignment with other sequences available in the "GenBank" database was made by the program MEGA 6.

2.4 Antifungal activity of isolated endophytic fungi on phytopathogens

The phytopathogenic fungi used were: *Bipolaris* sp. isolated from *B. brizantha* cv. Piatã, *Fusarium verticillioides* (CML 766, 2006) unspecified host, *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from bean and *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from coffee.

A small fragment of mycelium of endophytic fungi isolated from previously grown forage plants were placed on one side of the Petri plate containing PDA and incubated for 7 days at 25°C in BOD. After these 7 days, a 3 to 5 mm diameter fragment of phytopathogenic fungus colony growth was inoculated on the opposite side of each plate containing the endophytic fungus. The plate was incubated at 25°C in BOD for 7 more days to verify possible inhibition of the plant phytopathogenic fungus by the endophytic. An adaptation of the procedure relating to the time of incubation of the plates was for fifteen

days and not seven days as in this work was taken (adapted from KELEMU, et al. 2001). The endophytic fungi that inhibited growth of phytopathogen in the first test were inoculated onto Petri dishes with the partition along with the phytopathogens to verify that inhibition was due to the presence of volatile compounds or compounds secreted by the endophytic fungi in the culture medium. If the inhibition of the phytopathogen occurs in the partition plates, it can be concluded that(s) compound(s) produced(s) by the endophytic fungus is volatile.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Isolation and molecular identification of endophytic fungi

Were isolated 84 endophytic fungi (Tables 2), 64,29% isolated from samples obtained from experimental field, 33,33% from pasture and 2,38% plants from the greenhouse. Regarding *Brachiaria* species were isolated endophytic fungi 51,19% from *B. ruziziensis*, 25% from *B. brizantha*, 7,14% from *B. decumbens*, 11,9% from *B. humidicola*, 1,2% from *B. mutica* and 3,57% from hybrid mulatto grass. For molecular identification the genus/species of the endophytic fungi was suggested according to utmost reliability in the deposited sequences in the "GenBank" database (Table 3).

Table 2 Number of endophytic fungi isolated by location, environment and species of *Brachiaria*

Identification	Location/Environment	Genus/species/cultivar
47/BBMB2.1	Belém - Experimental field	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu
28/BBMB1M	Belém - Experimental field	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu
39/BBPB4.1	Belém - Experimental field	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Piatã
66/BBPB4.2	Belém - Experimental field	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Piatã
48/BBXB3.1	Belém - Experimental field	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés
41/BRB2.1	Belém - Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
36/BRB4.3	Belém - Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
53/BMMT4.1	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu
72/BMMT1.3	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu
62/BMMT5.1	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu
60/BMMT1.1	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu
73/BMMT1.2	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu
56/BXMT3.1	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés
65/BXMT4.1	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés
57/BPMT5.1	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Piatã
74/BPMT5.2	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Piatã
69/BMIMT2.1	Campo Grande - Pasture	Híbrido capim mulato II
63/BBMT3.1	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria decumbens</i> cv. Basilisk
54/BCMT1.1	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria humidicola</i>
55/BCMT4.1	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria humidicola</i>
61/BCMT1.3	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria humidicola</i>
50/BLMT4.1	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria humidicola</i> cv. Llanero
58/BLMT3.1	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria humidicola</i> cv. Llanero

“continue”

Table 2

Identification	Location/ Environment	Genus/species/cultivar
59/BLMT2.1	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria humidicola</i> cv. Llanero
64/BTMT2.1	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria humidicola</i> cv. Tupi
68/BTMT2.3	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria humidicola</i> cv. Tupi
67/BTMT2.2	Campo Grande - Pasture	<i>Brachiaria humidicola</i> cv. Tupi
20/BBMU1	Lavras – Experimental field	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu
21/BBMU2	Lavras - Experimental field	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu
27/BRBMUM	Lavras – Experimental field	Híbrido capim mulato I
19/BRBMU	Lavras - Experimental field	Híbrido capim mulato I
40/BHQ1.1	Lavras – Experimental field	<i>Brachiaria humidicola</i>
42/BMAU4.1	Lavras - Experimental field	<i>Brachiaria mutica</i> Angola
22/BBME1A	Juiz de Fora - Pasture	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu
29/BBME1.2	Juiz de Fora - Pasture	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu
25/BBME1.1	Juiz de Fora - Pasture	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu
26/BDE1.2	Juiz de Fora - Pasture	<i>Brachiaria decumbens</i>
33/BDE1.0	Juiz de Fora - Pasture	<i>Brachiaria decumbens</i>
34/BDE1.1	Juiz de Fora - Pasture	<i>Brachiaria decumbens</i>
31/BBXE1	Juiz de Fora - Pasture	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés
32/BBXE2	Juiz de Fora - Pasture	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés
52/JAGQ1.1	Juiz de Fora - Greenhouse	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
71/JAGQ1.1	Juiz de Fora - Greenhouse	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
80/3D	Juiz de Fora - Experimental field	<i>Brachiaria decumbens</i>
81/3D1	Juiz de Fora - Experimental field	<i>Brachiaria decumbens</i>

“continue”

Table 2

Identification	Location/ Environment	Genus/species/cultivar
94/2R	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
75/1R	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
76/1R1	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
91/10R	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
114/4R1	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
115/9R7	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
77/1R2	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
78/1R3	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
79/2R1	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
82/4R2	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
83/4R7	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
84/5R	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
85/5R1	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
86/6R	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
87/8R	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
88/8R1	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
89/9R	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
90/9R1	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
92/10R1	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
93/10R3	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
95/4R	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
96/4R4	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruzizensis</i>

“continue”

Table 2 “conclusion”

Identification	Location/ Environment	Genus/species/cultivar
97/4R5	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
98/4R6	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
99/6R1	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
100/6R2	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
101/6R3	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
102/6R4	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
103/8R2	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
104/8R3	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
105/9R2	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
106/9R3	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
107/9R4	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
108/9R5	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
109/9R6	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
110/10R2	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
111/10R4	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
112/10R5	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
113/7R	Juiz de Fora – Experimental field	<i>Brachiaria ruziziensis</i>

Table 3 Molecular identification of endophytic fungi through the regions ITS and 18S of genus *Brachiaria*

Endophytic fungi isolated	ITS	18S	Identification genus/species
19/BRBMU	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
20/BBMU1	<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i> complex	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> complex
21/BBMU2	<i>Sarocladium strictum</i>	<i>Sarocladium zeae</i>	<i>Sarocladium strictum</i>
22/BBME1A	<i>Sarocladium strictum</i>	<i>Sarocladium</i> <i>bactrocephalum</i>	<i>Sarocladium strictum</i>
25/BBME1.1	<i>Sarocladium</i> sp.	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium</i> sp.
26/BDE1.2	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i> complex
27/BRBMUM	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
28/BBMB1M	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
29/BBME1.2	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
31/BBXE1	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
32/BBXE2	<i>Cladosporium flabelliforme</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium flabelliforme</i>
33/BDE1.0	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala spinifera</i>	<i>Exophiala spinifera</i>
34/BDE1.1	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
36/BRB4.3	<i>Meira</i> sp.	<i>Meira</i> sp.	<i>Meira</i> sp.
39/BBPB4.1	-	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
40/BHQU1.1	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
41/BRB2.1	-	<i>Meira</i> sp.	<i>Meira</i> sp.
42/BMAU4.1	-	<i>Selenophoma</i> sp.	<i>Selenophoma</i> sp.
25/BBME1.1	<i>Sarocladium</i> sp.	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium</i> sp.
27/BRBMUM	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
47/BBMB2.1	Unidentified	<i>Plenodomus</i> sp.	<i>Plenodomus</i> sp.

“continue”

Table 3

Endophytic fungi isolated	ITS	18S	Identification genus/species
53/BMMT4.1	-	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium</i> sp.
54/BCMT1.1	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
55/BCMT4.1	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
56/BXMT3.1	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus terreus</i>
57/BPMT5.1	<i>Acremonium curvulum</i>	<i>Acremonium curvulum</i>	<i>Acremonium curvulum</i>
58/BLMT3.1	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
59/BLMT2.1	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
60/BMMT1.1	-	<i>Dissoconium</i> sp.	<i>Dissoconium</i> sp.
61/BCMT1.3	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Paradendryphiela</i> sp.	<i>Curvularia lunata</i>
62/BMMT5.1	-	<i>Ramichloridium apiculatum</i>	<i>Ramichloridium apiculatum</i>
63/BBMT3.1	<i>Phoma sorghina</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma sorghina</i>
64/BTMT2.1	Unidentified	Unidentified	Unidentified
65/BXMT4.1	<i>Sarocladium kiliense</i>	-	<i>Sarocladium kiliense</i>
66/BBPB4.2	Unidentified	Unidentified	Unidentified
67/BTMT2.2	Unidentified	<i>Plenodomus</i> sp.	<i>Plenodomus</i> sp.
68/BTMT2.3	Unidentified	-	Unidentified
69/BMIMT2.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> complex	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> complex
50/BLMT4.1	<i>Phoma sorghina</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma sorghina</i>
71/JAGQ1.1	Unidentified	-	Unidentified
72/BMMT1.3	-	<i>Dissoconium</i> sp.	<i>Dissoconium</i> sp.
73/BMMT1.2	<i>Ramichloridium apiculatum</i>	<i>Dissoconium</i> sp.	<i>Ramichloridium</i> sp.
74/BPMT5.2	-	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium</i> sp.

"continue"

Table 3

Endophytic fungi isolated	ITS	18S	Identification genus/species
75/1R	-	-	Unidentified
76/1R1	<i>Phoma sorghina</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma sorghina</i>
77/1R2	<i>Phoma sorghina</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma sorghina</i>
78/1R3	<i>Phoma sorghina</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma sorghina</i>
79/2R1	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
80/3D	-	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
81/3D1	<i>Phoma sorghina</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma sorghina</i>
82/4R2	<i>Phoma sorghina</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma sorghina</i>
83/4R7	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
84/5R	<i>Phoma sorghina</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma sorghina</i>
85/5R1	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
86/6R	-	Unidentified	Unidentified
87/8R	<i>Phoma sorghina</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma sorghina</i>
88/8R1	<i>Phoma sorghina</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma sorghina</i>
89/9R	<i>Phoma brasiliensis</i>	Unidentified	<i>Phoma brasiliensis</i>
90/9R1	<i>Microdochium</i> sp.	Unidentified	<i>Microdochium</i> sp.
91/10R	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
92/10R1	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	-	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
93/10R3	<i>Phoma sorghina</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma sorghina</i>
94/2R	<i>Sarocladium spinificis</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium spinificis</i>
95/4R	<i>Phoma</i> aff. <i>henningsii</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma</i> aff. <i>henningsii</i>
96/4R4	<i>Sarocladium strictum</i>	<i>Sarocladium bactrocephalum</i>	<i>Sarocladium strictum</i>

"continue"

Table 3 “conclusion”

Endophytic fungi isolated	ITS	18S	Identification genus/species
52/JAGQ1.1	-	-	Unidentified
97/4R5	-	<i>Setophoma</i> sp.	<i>Selenophoma</i> sp.
98/4R6	-	<i>Parastagonospora nodorum</i>	<i>Parastagonospora nodorum</i>
99/6R1	Unidentified	Unidentified	Unidentified
100/6R2		<i>Sarocladium</i>	
	<i>Sarocladium strictum</i>	<i>bactrocephalum</i>	<i>Sarocladium strictum</i>
101/6R3	Unidentified	<i>Plenodomus</i> sp.	<i>Plenodomus</i> sp.
102/6R4	Unidentified	<i>Plenodomus</i> sp.	<i>Plenodomus</i> sp.
103/8R2	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
104/8R3	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	-	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
105/9R2		<i>Sarocladium</i>	
	<i>Sarocladium strictum</i>	<i>bactrocephalum</i>	<i>Sarocladium strictum</i>
106/9R3	-	-	Unidentified
107/9R4	Unidentified	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.
108/9R5	Unidentified	Unidentified	Unidentified
109/9R6	Unidentified	<i>Plenodomus</i> sp.	<i>Plenodomus</i> sp.
110/10R2	<i>Myrothecium</i> sp.	<i>Myrothecium</i> sp.	<i>Myrothecium</i> sp.
111/10R4	-	<i>Plenodomus</i> sp.	<i>Plenodomus</i> sp.
112/10R5	Unidentified	<i>Plenodomus</i> sp.	<i>Plenodomus</i> sp.
113/7R		<i>Sarocladium</i>	
	<i>Sarocladium strictum</i>	<i>bactrocephalum</i>	<i>Sarocladium strictum</i>
114/4R1	<i>Setophoma</i> sp.	<i>Setophoma terrestris</i>	<i>Setophoma terrestris</i>
115/9R7		<i>Sarocladium</i>	<i>Sarocladium strictum</i>
	<i>Sarocladium strictum</i>	<i>bactrocephalum</i>	
48/BBXB3.1	<i>Myrmecridium schulzeri</i>	Unidentified	<i>Myrmecridium schulzeri</i>

Some sequences amplified by *primers* showed low nucleotide identity with sequences deposited in the database, so it has not been possible to identify 10 endophytic fungi. Other *primers* can be used in order to identify these endophytic fungi.

Most of the endophytic fungi belong to the phylum *Ascomycota*. Only two fungi belong to the phylum *Basidiomycota*. Similar results have been reported by some authors where they relate that the majority of endophytic fungi isolated from plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis* belong to the phylum *Ascomycota*, whereas some species belonging the phylum *Basidiomycota* and *Zygomycota* (HUANG et al., 2001). The two representatives of *Basidiomycota* were isolated from *B. ruziziensis* cultivated in field.

From the *B. brizantha* samples from the experimental field the fungi *Cladosporium cladosporioides* complex, *Sarocladium strictum*, *Paraconiothyrium* sp. and *Myrmecridium schulzeri* were isolated. Samples from this same species from pasture the fungi *Sarocladium* sp., *Paraconiothyrium* sp., *Dissoconium* sp., *Ramichloridium* sp., *Ramichloridium apiculatum*, *Cladosporium flabelliforme*, *Aspergillus terreus*, *Sarocladium strictum*, *Sarocladium kiliense* and *Acremonium curvulum* were isolated. It can be observed that different genera of fungi were isolated from the same plants species grown in the experimental field and pasture. This difference in endophytic fungi population may be related to differences in the soil chemical-physical composition, temperature variation of these sites and especially the presence of animals in the pasture area.

For the species *B. ruziziensis* from the experimental field wer isolated 41 endophytic fungi (2 *Meira* sp., 6 *Phoma sorghina*, 2 *Setophoma terrestris*, 7 *Paraconiothyrium* sp., 5 *Sarocladium strictum*, 5 *Plenodomus* sp., *Fusarium oxysporum*, *Phoma brasiliensis*, *Microdochium* sp., *Sarocladium spinificis*, *Phoma* aff. *henningsii*, *Selenophoma* sp., *Parastagonospora nodorum*,

Acremonium sp., *Myrothecium* sp. and 5 unidentified). From the greenhouse sample 2 endophytic fungi were isolated, which were not identified. The number of samples obtained from the experimental field was larger and reflects the greater number of isolated and identified fungal species.

Only two samples of *B. humidicola* from the experimental field were obtained and only the fungus isolated from these samples was *Paraconiothyrium* sp.. In the three samples from the pasture, 11 endophytic fungi with 5 *Paraconiothyrium* sp., 1 *Curvularia lunata*, 2 *Phoma sorghina*, 1 *Plenodomus* sp. and 2 unidentified were isolated.

Fusarium oxysporum and *Phoma sorghina* were isolated in the *B. decumbens* sample from the experimental field. However in sample of this same plant from pasture *Exophiala spinifera*, *Fusarium solani* complex, *Paraconiothyrium* sp. and *Phoma sorghina* were isolated. In the sample of mulatto hybrid grass, obtained from the pasture, *Cladosporium cladosporioides* was isolated and the sample obtained from the experimental field *Paraconiothyrium* sp. was isolated. In one sample of *B. mutica* Angola from the experimental fields only the fungus *Selenophoma* sp. was isolated.

Molecular evidence suggests that in some grasses, endophytic grasses are infected by a single genotype of the fungus (KOVER et al., 1997), as the grass *Festuca arizonica* that hosts the endophytic fungus *Neotyphodium*, which usually produces alkaloids at low levels to deter herbivores and makes the plant more resistant to abiotic and biotic factors (SAARI and FAETH, 2012; FAETH, 2002; BUSH, WILKINSON and SCHARDL, 1997).

The genera/species were discovered in the species/cultivars of *Brachiaria* were *Paraconiothyrium*, *Phoma sorghina*, *Plenodomus* and *Sarocladium strictum*. Some species of fungi were isolated in larger quantities which may indicate a dominance among the population of endofitic fungi in these plants (PILEGGI, 2006).

The genus *Phoma* consists of a large group of fungi that are found in different environments and has been isolated as endophytic in *Brachiaria* (RODRIGUES and DIAS-FILHO, 1996). The *Phoma sorghina* species is common in tropical and subtropical regions, and has been linked to diseases in cereals such as sorghum and wheat and forage grasses (PERELLÓ and MORENO, 2005). However, *P. sorghina* was isolated from the medicinal plant *Tithonia diversifolia* producing three new anthraquinones (1,7-dihydroxy-3-methyl-9,10-anthraquinone, 1,6-dihydroxy-3-methyl-9,10-anthraquinone and 1-hydroxy-3-methyl-9,10-anthraquinone), which are known to have antimicrobial function and fight colon cancer and leukemia (BORGES and PUPO, 2006).

The genera *Plenodomus*, *Paraconiothyrium*, *Selenophoma* and *Setophoma* were created to regroup fungi previously described as *Phoma* (WOUDENBERG et al., 2010; GRUYTER et al., 2012). The molecular identification also of these genera has limitations especially when few regions of the genome are used to identify regions or where they do not allow identification to the species level. For these and other fungi more detailed studies should ideally be carried out and a polyphasic identification of the isolated fungi. Fungi of *Plenodomus* have been isolated from *Anacyclus radiatus*, *Fraxinus excelsior* and *Pyrus malus* plants (ALVES et al., 2013). Species of the genus *Paraconiothyrium* also has been reported as endophytic of *Coffea arabica* in Brazil, and *Ginkgo biloba*, *Prunus persica*, *Cephalotaxus harringtoni* and *Laurus nobilis* (COMBÈS et al., 2012; DAMM et al., 2008), as isolates from soil (FUKAMI et al., 2000).

Some species of fungi isolated in this study belong to the genera *Sarocladium*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Phoma*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Mycrodochium*, *Exophiala*, *Ramichloridium*, *Plenodomus*, *Selenophoma*, *Setophoma*, *Dissoconium* and *Myrothecium* and already have been cited as responsible for causing disease in various cultures, among them

passion fruit, soybean, tomato, cotton, lemon, rye, rice, corn, orchids, sweet potato and pasture, as well as being human pathogens (BARROS and JULIATTI, 2012; BENSCH et al., 2010; NEGREIROS et al., 2004; MICHEREFF and BARROS, 2001; GÁSPERI, PRESTES and COSTAMILAN, 2003; MALDONADO, RUNCO and NAVARRO, 2005; LUCCA-FILHO, PORTO and MAIA, 1999; RIBEIRO et al., 2003; ROESE et al., 2001; CHITARRA and MEYER, 2004; KIMARI et al., 1997). However, *Sarocladium*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Phoma*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Setophoma*, *Mycrodochium*, *Ramichloridium* and *Selenophoma* were found as endophytes and some with antifungal potential (ARNOLD, 2008; WANG et al., 2013; MAGALHÃES et al., 2008; MARTINS et al., 2013; WU et al., 2013; ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

Pathogenicity of fungi isolated in this study could be confirmed if we had more details identifying the species and if it were one described as phytopathogenic. Furthermore, it would have to be demonstrated that these species of isolated fungi could cause disease in *Brachiaria* and/or other cultures. *Brachiaria* samples obtained in this study were healthy and without apparent disease symptoms indicating that these fungi have a symbiotic relationship with the host plant. In most cases studied the plant/endophytic fungus association has been very beneficial and may be related to plant health, as some endophytic fungi act in controlling the growth of pathogenic microorganisms, inhibit herbivory by insects, or other activities that together, increase the adaptive capacity of the plant (CLAY and SCHARDL, 2002). Grasses infected by endophytic fungi did not exhibit any defense response despite extensive branching hyphae in the plant body. However, inoculation of endophytic fungi in different host species can result in cell death (KOGA et al., 1993).

Fungi, well known as endophytic belong to the genus *Acremonium*. Saprophytic and pathogenic species for humans and plants can also be found

(SUMMERBELL et al., 2011; ABELLO, KELEMU and GARCIA, 2008; GLENN et al., 1996). In a study by Braz et al. (2009) with *Acremonium* cultures from the URM culture Collection of the Federal University of Pernambuco, showed that of the 24 fungi tested, 12 showed protease activity and 16 amylolytic. Approximately 95 species are described within this genus excluding endophytic species that were transferred to the genus *Neotyphodium* (SUMMERBELL et al., 2011). Some species of *Acremonium* have been reported as endophytes of grasses, among them *A. implicatum* presenting antifungal potential against *Drechslera* sp. (ABELLO, KELEMU and GARCIA, 2008; KELEMU et al., 2001). In *Fescue* and Ryegrass (*Lolium perene* L.) the endophytes fungi *A. coenophialum* and *A. lolii* have been reported to infect these and causing symptoms of the disease summer syndrome in cattle and neurotoxicose in sheep (BACON et al., 1977; FLETCHER and HARVEY, 1981).

In a study by Summerbell et al. (2011), they transferred 7 fungal species previously included in the genus *Acremonium* to the genus *Sarocladium*. This study was based on phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the LSU rDNA region. Among the species included *S. strictum*, *S. kiliense* and *S. zaeae* are reported. The species *S. kiliense* and *S. strictum* were isolated in this work, and *S. kiliense* was isolated from *B. brizantha* and *S. strictum* from *B. brizantha* and *B. ruziziensis*. This is the first report of these species as endophytic of *Brachiaria*. *Sarocladium* species are frequently associated with grasses reported as saprophytes, parasites or endophytes (GAMS and HAWKSWORTH, 1976; SUMMERBELL et al., 2011).

Fungi belonging to the genus *Meira* were isolated from *B. ruziziensis* from the experimental field. This genus was inserted in the phylum *Basidiomycota* reputable the anamorph of the fungus was *Acaromyces* (BOEKHOUT et al., 2003). The species *M. geulakonigii* and *M. argovae*, were

isolated from mites in Israel, as they were considered acaropatogenic (BOEKHOUT et al., 2003; SZTEJNBERG et al., 2004). Another study reports the isolation of a new species of the genus named *M. nashicola* sp. Nov. This fungus was isolated from the surface of Japanese pear fruit with reddish spots (YASUDA et al., 2006). The isolation of a species of the genus *Meira* has been reported for the first time as endophytic of *Brachiaria* and more studies should be conducted to characterize this fungus.

Few studies on isolation of endophytic fungi of grasses of the genus *Brachiaria* are described in the literature. In Brazil, we only have the account of Rodrigues and Dias-Filho (1996), where these authors isolated the fungi *Acremonium* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Stagnospora* sp. and *Trichoderma viride* in *Brachiaria* cv. Marandu, and *Curvularia* cf. *pallescens*, *Leptosphaeria* sp., *Phomopsis* sp., *Physalospora* sp., *Fusarium* sp. and *Phoma* sp. samples of *B. humidicola* cultivated in the state of Pará.

The endophytic fungus *Acremonium curvulum* was isolated from *Brachiaria* cv. Piatã and *Curvularia lunata* of *B. humidicola* samples collected in Campo Grande (MT). It may be that the genus of endophytic fungi are common in these species of grass. Samples of *Brachiaria* and *B. ruziziensis* were collected in Belém in Pará, but endophytic fungi belonging to the same genus/species found in the work cited above were not isolated. These results show that within the *Brachiaria* species can be a wide diversity of endophyte fungi.

Kelemu, White and Rao (2000), reported that under moderate stress levels, the presence of *Acremonium implicatum* an endophytic isolate of *B. brizantha*, *B. decumbens* CIAT 606 and *B. arrecta* CIAT 16845, has no significant effect on the branch growth characteristics of *B. arrecta* CIAT 16845, but under severe water stress, plants infected with the endophytic,

maintain better leaf expansion and produce significantly more leaf biomass than endophyte-free plants. In inhibition against pathogenic fungus *Drechslera* sp. *vivo* a reduction has been verified in disease symptoms and sporulation of pathogenic fungi in *B. brizantha* leaves (KELEMU et al., 2001). With the reduction of the disease symptoms, Kelemu et al. (2003) designed a pair of *primers* specific for the detection of *A. implicatum* in *Brachiaria* tissues. It was observed that the fungus *A. implicatum* concentrated in the leaf sheaths. Relating to the present study there had not isolated from *A. implicatum* in *Brachiaria*, but isolates of *Acremonium* sp. in *B. ruziziensis* and *A. curvulum* in *B. brizantha* cv. Piatã.

Thus, although the results they contribute to a greater knowledge of the identity of endophytic fungi present in these plants. This is the first report of fungi of the genera/species *Paraconiothyrium*, *Plenodomus*, *Meira*, *Paratagonospora nodorum*, *Dissoconium*, *Cladosporium flabelliforme*, *Exophiala spinifera*, *Aspergillus terreus*, *Ramichloridium*, *Ramichloridium apiculatum*, *Phoma sorghina*, *Phoma brasiliensis*, *Phoma* aff. *Henningsii*, *Microdochium*, *Myrmecridium*, *Myrmecridium schulzeri*, *Myrothecium*, *Sarocladium spinificis*, *Sarocladium strictum*, *Sarocladium kiliense*, *Cladosporium cladosporioides* complex, *Fusarium solani* complex, *Fusarium oxysporum*, *Selenophoma*, *Acremonium curvulum*, *Curvularia lunata* and *Setophomaterrestris* in the grasses of the *Brachiaria* genus.

3.2 Antifungal activity of endophytic fungi

In vitro tests showed that 10 endophytic fungi potential for growth inhibition of the fungus phytopathogenic *S. sclerotiorum* (Table 4). Most fungi that showed growth inhibition of *S. sclerotiorum* were isolates of *B. brizantha*.

Interestingly, four of endophytic fungi that showed moderate growth inhibition of *S.sclerotiorum* belong to the genus *Paraconiothyrium*. Isolation of species of this genus as endophytic of *Brachiaria* and presenting growth inhibition action on *S.sclerotiorum* is reported for the first time. Isolated species of *Paraconiothyrium* have attracted attention due to reports as producers enzyme, potential against cancer cells and antifungal potential (COMBÈS et al., 2012; KHAN et al., 2012; FOROOTANFAR et al., 2011; SASAKI et al., 2006). A study showed the endophytic fungus *Paraconiothyrium variabile* isolated from the host plant *Cephalotaxus harringtoni* has antifungal potential against the plant phytopathogen *Fusarium oxysporum*. One metabolite was identified as 13-oxo-acid-9,11-octadecadienoic acid. This metabolite is notable for its the negativity of the beauvericin biosynthesis, one of the most potent mycotoxins of *Fusarium oxysporum* during the competition with endophyte (COMBÈS et al., 2012).

Table 4 Endophytic fungi isolated from *Brachiaria* with action in inhibiting the growth of *S.sclerotiorum*

ENDOPHYTIC FUNGI	SPECIES / CULTIVAR
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	Mulato I hybrid grass
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>B. brizantha</i> cv. Xaraés
<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>B. brizantha</i> cv. Xaraés
<i>Cladosporium flabelliforme</i>	<i>B. brizantha</i> cv. Xaraés
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>B. brizantha</i> cv. Piatã
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	<i>B. humidicola</i> common
<i>Acremonium curvulum</i>	<i>B. brizantha</i> cv. Piatã
Unidentified	<i>B. ruzizensis</i>
<i>Dissoconium</i> sp.	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu
<i>Setophoma terrestris</i>	<i>B. ruzizensis</i>

Shiono et al. (2011) isolated a species of the endophytic fungus *Paraconiothyrium* from Beech trees in Japan. This fungus produced six diterpenes compounds that had cytotoxic effects against human leukemia cells.

In another study, *Paraconiothyrium* sp. was isolated as endophytic from *Rheedia brasiliensis* leaves. The results showed that the crude extract of the fungus presented substances able to scavenge free radicals and inhibit the growth of malignant human cells (HaCaT cells) and may be used in the treatment of psoriasis (CARVALHO et al., 2012). Works on the characterization of endophytic fungi from this genus isolated in this work can be interesting, as may present bioactive substances with the potential to be used both in industry, medicine and agriculture

Another species that showed inhibition of *S.sclerotiorum* was *Acremonium curvulum*. This species has never been described as endophytic of grass and with inhibition potential against plant phytopathogenic fungus. There is a report of this isolated species as endophytic of the plant *Ananas lucidus* and a producer of 2-phenylethyl hydroxypropanoate, ergosterol and tryptophol. They are used as fungal indicators in seeds and leaves, precursors for production of indole acetic acid (IAA) and plant growth promotion (RODRIGUES, 2009). The endophytic fungus *A. implicatum* was isolated from *B. brizantha* CIAT in Colombia. In assessing the *in vivo* inhibition against plant phytopathogenic fungus *Drechslera* sp. a reduction in disease symptoms and phytopathogenic sporulation on the leaves of plants *B.brizantha* was verified (KELEMU et al., 2001).

Another fungus that had not been reported as endophytic of grasses and showed growth inhibition of *S.sclerotiorum* was *Cladosporium flabelliforme*. There are reports in the literature *C. flabelliforme* antifungal potential. Other endophytic fungi that had inhibiting action on *S.sclerotiorum* were *Dissoconium* sp., already cited as plant pathogens and *Setophoma terrestris* causing root rot in melon (*Cucumis melo* L.), watermelon (*Citrullus lanatus*) and zucchini (*Curcubita pepo* Linnaeus) (BRUTON, BILES and DUTHIE, 1997; FARR et al., 1989). However, Wu et al. (2013) isolated *S. terrestris* as endophyte of the

plant *Panax ginseng* Meyer, and concluded that they can protect plants by producing bioactive compounds. The soil fungus and opportunistic human pathogen known as *Acremonium kiliense* was relocated to the genus *Sarocladium* and named as *S. kiliense* (SUMMERBELL et al., 2011). A strain of *S. kiliense* was isolated from the gut of *Apriona germari* collected on the Campus of Jiangsu Normal University, Jiangsu Province, China. The fractionation of the extract EtOH of *S. kiliense* cultivated in rice by a combination of chromatographic methods led to the isolation of three similar lasiodiplodins: (3S), (6R)-6-hydroxylasiodiplodin, (3R)-lasiodiplodin (3R), (5S)-5-hydroxylasiodiplodin. Lasiodiplodin analogs effectively inhibit prostaglandin biosynthesis, and has antileukemic and antimicrobial activities (YUAN et al., 2013).

Growth inhibition of *S. sclerotiorum* by endophytic fungi is not likely in some of the synthesis(s) molecule(s) volatiles, since no inhibition was observed when these fungi were grown in split plates. These fungi phytopathogenic when challenged against endophytes into split plates had sclerotia a structure that is unfavorable to resistance to fungal growth environment and when that were plated without partition had no sclerotia. These findings allow the direction of future efforts to identify compounds produced by these isolates.

No growth inhibition was observed of phytopathogenic fungus *Bipolaris* sp., *Fusarium verticillioides* and *Colletotrichum gloeosporioides* by endophytic fungi isolated from *Brachiaria* plants.

It is the first report of endophytic fungi isolated in this study of *Brachiaria*, and antifungal potential against *S. sclerotiorum*. This is an interesting result, which could be explored in future *in vivo* studies and also in search of the compound(s) produced by the endophytic fungi that can be used to control the growth of this and other plant phytopathogenic fungi, such as being used in medicine, industry and agriculture.

4 CONCLUSION

The *Brachiaria* species that had the greatest number of isolates were *B. ruziziensis* and *B. brizantha*. The isolates belong to the phylum *Ascomycota* and two of *Basidiomycota* that were isolated from *B. ruziziensis*. The genera *Paraconiothyrium* and *Phoma asorghina* presented a higher number of isolates in *Brachiaria*. Ten fungi showed antifungal activity against *S. sclerotiorum*, and the compound(s) which inhibited the plant phytopathogenic fungus were synthesized in the culture medium.

REFERENCES

- ABELLO, J.; KELEMU, S.; GARCÍA, C. *Agrobacterium*-mediated transformation of the endophytic fungus *Acremonium implicatum* associated with *Brachiaria* grasses. **Mycological Research**, n.112, p. 407 - 413, 2008.
- ALVES, J.L.; WOUDEMBERG, J.H.C.; DUARTE, L.L.; CROUS, P.W.; BARRETO, R.W. Reappraisal of the genus *Alternariaster* (*Dothideomycetes*). **Persoonia**, v. 31, p. 77 – 85, 2013.
- ARAÚJO, W. L. Microrganismos 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.
- ARNOLD, A.E. Endophytic fungi: Hidden components of tropical community ecology. In: SCHNITZER, S.A.; CARSON, W.P.(Eds). **Tropical forest community ecology**, Blackwell Scientific, 2008. p. 254-271.
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 189-207.
- BACON, C.W.; PORTER, J.K.; ROBBINS, J.D.; LUTRELL, E.S. Epichloe typhina from toxic tall fescue grass. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 34, p. 576-81, 1977.
- BARROS, F.C.; JULIATTI, F.C. levantamento de fungos em amostras recebidas no laboratório de micologia e proteção de plantas da Universidade Federal de Uberlândia, no período 2001-2008. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 77 - 86, 2012.
- BENSCH, K.; GROENEWALD, J.Z.; DIJKSTERHUIS, J.; STARINK-WILLEMSE, M.; ANDERSEN, B.; SUMMERELL, B.A.; SHIN, H. D.; DUGAN, F.M.; SCHROERS, H.J.; BRAUN, U.; CROUS, P.W. Species and

ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). **Studies in Mycology**, v. 67, p. 1 - 94, 2010.

BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HOUBRAKEN, J.; ROBERT, V.; SCORZETTI, G.; GAFNI, A.; GERSON, U.; SZTEJNBERG, A. Novel anamorphic mite-associated fungi belonging to the Ustilaginomycetes: *Meira geulakonigii* gen. nov., sp. nov., *Meira argovae* sp. nov. and *Acaromyces ingoldii* gen. nov., sp. nov. **Int.J. Syst. Evol.Microbiol**, v. 53, p.1655 – 1664, 2003.

BORGES, W.S.; PUPO, M.T. Novel Anthraquinone Derivatives Produced by *Phoma sorghina*, an Endophyte Found in Association with the Medicinal Plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, p. 929 - 934, 2006.

BRAZ, S.C.M.; MOTTA, C.M.S.; MASSA, D.M.L.; NEVES, R.P.; MAGALHÃES, O.M.C. Viabilidade, confirmação taxonômica e detecção enzimática de espécies de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas da Universidade de Recife. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 63 - 66, 2009.

BRUTON, B.D.; BILES, C.L.; DUTHIE, J.A. Pink root of muskmelon and watermelon caused by *Phoma terrestris*. **Subtropical Plant Science**, v. 49, p. 34 – 41, 1997.

BUSH, L.P.; WILKINSON, H.H.; SCHARDL, C.L. Bioprotective alkaloids of grass–fungal endophyte symbioses. **Plant Physiol.**, v. 114, p. 1 – 7, 1997.

CARVALHO, P.L.N.; AMARAL, P.O.; RUIZ, A.L.T.G.; ALENCAR, S.M.; PFENNING, L.H.; CARVALHO, J.E.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1: Antioxidant and Antiproliferative Activities an Endophytic Fungus Associated with *Rheedia brasiliensis* Plant. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 1, p.172 - 176, 2012.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. Further Researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p.181 - 184, 1967.

CHITARRA, L. G.; MEYER, M. C. Primeiro relato da mancha de *Myrothecium* em algodão, no Estado de Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 543, 2004.

CLAY, K.; SCHARDL, C.L. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **American Naturalist**, v. 160, p.99 – 127, 2002.

COMBÈS, A.; NDOYE, I.; BANCE, C.; BRUZAUD, J.; DJEDIAT, C.; DUPONT, J.; NAY, B.; PRADO, S. Chemical Communication between the Endophytic Fungus *Paraconiothyrium Variabile* and the Phytopathogen *Fusarium oxysporum*. **PLoS ONE**, v. 7, n.10, 2012.

DAMM, U.; VERKLEY, G.J.M.; CROUS, P.W.; FOURIE, P.H.; HAEGI, A.; RICCIONI, L. Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. **Persoonia**, v. 20, p. 9 – 17, 2008.

FAETH, S.H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **Oikos**, v. 98, p. 25 – 36, 2002.

FARR, D.F.; BILLS, G.F.; CHAMURIS, G.P.; ROSSMAN, A. Y. **Fungi on plants and plant products in the United States**. St. Paul:APS Press, 1989.

FLETCHER, L.R.; HARVEY, I.C. An association of a *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. **N.Z. Vet. J.**, v. 29, p.185 - 86, 1981.

FOROOTANFAR, H.; FARAMARZI, M.A.; SHAHVERDI, A.R.; YAZDI, M.T. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. **Bioresource Technology**, v.102, p. 1808 – 1814, 2011.

FUKAMI, A.; NAKAMURA, T.; KIM, Y.P.; SHIOMI, K.; HAYASHI, M.; NAGAI, T.; YAMADA, H.; KOMIYAMA, K.; OMURA, S. A new anti-influenza virus antibiotic, 10-norparvulenone from *Microsphaeropsis* sp FO-5050. **Journal of Antibiotics**, v. 53, p.1215 – 1218, 2000.

GAMS, W.; HAWKSWORTH, D.L. The identity of *Acrocyndrium oryzae* Sawada and a similar fungus causing sheath rot of rice. **Kavaka**, v. 3, p. 57 – 61, 1976.

GÁSPERI, A.C.; PRESTES, A.M.; COSTAMILAN, L.M. Reação de Cultivares de Soja à Podridão Vermelha da Raiz Causada por *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n.5, p. 544 - 547, 2003.

GLENN, A.E.; BACON, C.W.; PRICE, R.; HANLIN, R.T. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. **Mycologia**, v. 88, p. 369 – 383, 1996.

GRUYTER, J.; WOUDEBERG, J.H.C.; AVESKAMP, M.M.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Redisposition of phoma-like anamorphs in *Pleosporales*. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 1 – 36, 2012.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agriculture crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895 - 914, 1997.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; & SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 163 - 167, 2001.

KELEMU, S.; BADEL, J.L.; MORENO, C.X.; MILES, J.W. Virulence spectrum of South American isolates of *Colletotrichum gloesporioides* on selected *Sylosanthes guianensis* genotypes. **Plant Disease**, p. 1355 - 1358, 1996.

KELEMU, S.; DONGYI, H.; GUIXIU, H.; TAKAYAMA, Y. Detecting and differentiating *Acremonium implicatum*: Developing a PCR based method for an endophytic fungus associated with the genus *Brachiaria*. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 115 - 118, 2003.

KELEMU, S.; WHITE JÚNIOR, J.F.W.; MUÑOZ.F.; TAKAYAMA, Y. 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, p. 55 – 62, 2001.

KELEMU, S.; WHITE, J.F.; RAO, I.M. **The role of endophytic fungi in *Brachiaria*, a tropical forage grass**. Cali, Colombia :Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). New Brunswick, NJ, USA: Rutgers University, 2000, p. 1-10.

KHAN, A. L.; HAMAYUN, M.; HUSSAIN, J.; KANG, S. M.; LEE, I. J. The Newly Isolated Endophytic Fungus *Paraconiothyrium* sp. LK1 Produces Ascotoxin. **Molecules**, v. 17, p. 1103 - 1112, 2012.

KIMARI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia, 3ª edição**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997.

KOGA, P.S.; CAMPOS, O.R.; CAMPOS, A.R.; SANTOS, P.C. Comportamento de genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em relação a ação de insetos pragas, na região de Ilha Solteira-SP. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15, 1993, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SEB, 1993.

KONIG, G.M.; WRIGHT, A.D.; AUST, H.J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. Genticulol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 155 - 157, 1999.

KOVER, P.X.; DOLAN, T.E.; CLAY, K. Potential versus actual contribution of vertical transmission to pathogen fitness. **Proc. R. Soc. Lond.**, p. 203 - 218, 1997.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C., HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp, an endophytic fungus in *Artemisia annua*, **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 67-73, 2000.

LUCCA-FILHO, O.A.; PORTO, M.D.M.; MAIA, M.S..FUNGOS EM SEMENTES DE AZEVÉM-ANUAL (*Lolium multiflorum* Lam.) E SEUS EFEITOS NO ESTABELECIMENTO DA PASTAGEM. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 2, p.142 -147, 1999.

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, 2008.

MALDONADO, M.C.; RUNCO, R.S.; NAVARRO, A.R. Isolation, identification and antifungal susceptibility of lemon pathogenic and non pathogenic fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 22, p. 57 - 59, 2005.

MARTINS, F.; PEREIRA, J.A.; BENTO, A.; BAPTISTA, P. Diversidade e distribuição de fungos endofíticos em *Olea europaea* L. In: CONGRESSO IBÉRICO DE AGROINGENIERÍA Y CIENCIAS HORTICULAS. **Anais...** Madri, 2013.

MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife : UFRPE, Imprensa Universitária, 2001. 368 p.

NEGREIROS, J. R. S.; BRUCKNER, C.H.; CRUZ, C.D.; SIQUEIRA, PIMENTEL, L.D. Seleção de progênies de maracujazeiro-amarelo vigorosas e resistentes à verrugose *Cladosporium cladosporioides*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 272 - 275, 2004.

PEREIRA, A.V.; SOUZA SOBRINHO, F.; SOUZA, F.H.D.; LEDO, F.J.S. Tendências do melhoramento genético e produção de sementes forrageiras no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 7., 2003. **Anais....**Lavras. UFLA/GEN, 2003, p. 36 - 63.

PERELLÓ, A.E.; MORENO, M.V. First report of *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema Dorenbosch & van Kest on wheat leaves (*Triticum aestivum* L.) in Argentina. **Mycopathologia**, v. 59, p. 75 – 78, 2005.

PILEGGI, S.A.V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* mart. ex reiss. por meio de marcadores rapd e seu potencial farmacológico.** 2006. 141 f. Tese (Dotourado em Ciências Biológicas) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

RIBEIRO, S.A.L.; CAVALCANTI, M.A.Q.; FERNANDES, M.J.S.; LIMA, D.M.M. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n.2, p. 223 - 229, 2003.

RODRIGUES, A.C.P. **Estudos químicos de *Ananas* (*A. comosus*, *A. bracteatus*, *A. lucidus*) e dos fungos endofíticos (*Acremonium curvulum* e *Fusarium oxysporum*) isolado de *A. lucidus*.** 2009. 197 f. (Tese de doutorado) - Departamento de química orgânica e Inorgânica - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE.

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.

ROESE, A. D.; ROMANI, R. D.; FURLANETTO, C.; TANGARLIN, J. R.; PORTS, R. L. Levantamento de doenças na cultura da soja, *Glycine max* (L.) Merrill, em municípios da região Oeste do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 23, n. 5, p. 1293 - 1297, 2001.

SAARI, S.; FAETH, S.H. Hybridization of Neotyphodium endophytes enhances competitive ability of the host Grass. **New Phytologist**, v. 195, p. 231 – 236, 2012.

SASAKI, K.; MATSUDA, M.; HIRAJIMA, T.; TAKANO, K.; KONNO, H. Immobilization of Mn(II) Ions by a Mn-Oxidizing Fungus *Paraconiothyrium* sp.-Like Strain at Neutral pHs. **Materials Transactions**, v. 47, n. 10, p. 2457 – 2461, 2006.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Germany, v. 6, n. 109, p.661-686, 2005.

SHIONO, Y.; KIKUCHIA, M.; KOSEKI, T.; MURAYAMA, T.; KWON, E.; ABURAI, N.; KIMURA, K-I. Isopimarane diterpene glycosides, isolated from endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. MY-42. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1400 – 1405, 2011.

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**, p. 3 - 30, 2000.

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.

SZTEJNBERG, A.; PAZ, Z.; BOEKHOUT, T.; GAFNI, A.; GERSON, U. A new fungus with dual biocontrol capabilities: reducing the numbers of phytophagous mites and powdery mildew disease damage. **Crop Protect.**, v. 23, p.1125 – 1129, 2004.

VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v. 56, p. 460 - 472, 2009.

WANG, X.; RADWAN, M.M.; TARÁWNEH, A.H.; GAO, J.; WEDGE, D.E.; ROSA, L.H.; CUTLER, H.G.; CUTLER, S.J. Antifungal Activity against Plant Pathogens of Metabolites from the Endophytic Fungus *Cladosporium cladosporioides*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 61, p. 4551–4555, 2013.

WOUDENBERG, J. H.C.; AVESKAMP, M. M.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. **Mycologia**, v. 102, n. 5, p. 1066 – 1081, 2010.

WU, H.; YANG, H.Y.Y.; YOU, X.L.; LI, Y.H. Diversity of endophytic fungi from roots of *Panax ginseng* and their saponin yield capacities. **SpringerPlus**, v.2, n.107, p. 2 – 9, 2013.

YASUDA, F.; YAMAGISHI, D.; AKAMATSU, H.; IZAWA, H.; KODAMA, M.; OTANI, H. *Meira nashicola* sp. nov., a novel basidiomycetous, anamorphic yeastlike fungus isolated from Japanese pear fruit with reddish stain. **Mycoscience**, v. 47, p.36 – 40, 2006.

YUAN, W.H.; JIANG, N.; DONG, C.H.; WEI, Z.W.; WU, H.K.; CHEN, C.F.; ZHAO, Y.X.; ZHOU, S.L.; ZHANG, M.M.; ZHENG, W.F. Lasiodiplodin Analogues from the Endophytic Fungus *Sarocladium Kiliense*. **Chemical of Pharmaceutical Bulletin**, v. 61, n. 3, p. 363 – 365, 2013.

ZHANG, W.; KROHN, K.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. Bioactive Isocoumarins Isolated from the Endophytic Fungus *Microdochium bolleyi*. **J. Nat. Prod.**, v.71, p.1078 – 1081, 2008.

ZHANG, X.Y.; BAO, J.; WANG, G.H.; HE, F.; XU, X.Y.; QI, S.H. Diversity and Antimicrobial Activity of Culturable Fungi Isolated from Six Species of the South China Sea Gorgonians. **Microb Ecol.**, v. 64, p.617–627, 2012.

TERCEIRA PARTE – ARTIGO 2
IDENTIFICATION AND ANTIFUNGAL POTENTIAL OF
ENDOPHYTIC FUNGI ON *CYNODON*

Article written according to the standards of the journal (preliminary version)

1 INTRODUCTION

In Brazil, livestock systems are characterized by the use of pastures as a source of food for cattle. The forage grasses of tropical climate are alternatives in animal feeding because of their high production potential and low cost. (QUEIROZ, FONSECA and MOREIRA, 2005). The success of grassland in various environments is due to several adaptation mechanisms that allows the forage to overcome environmental stresses and their production and quality at favorable levels (PEREIRA et al., 2003). Among the various genres of forage used in the feeding of cattle, is the *Cynodon*. Grasses of this genus have great demand among ranchers as they have high nutritional value, positive response to fertilization, use grazing, silage and hay, grazing high strength and good cold tolerance (LIMA and VILELA, 2005). The *Cynodon* genus has been used as an alternative for feeding livestock and training of new grazing areas (PEDREIRA, 2005).

Endophytic microorganisms inhabit the interior tissues of plants organs or plant, from leaves, stems and roots, without causing harm to their hosts and do not produces structures external host plant. Studies show that many endophytes have a beneficial relationship with the plant they inhabit, providing some advantages to the host, protecting it against attack from insects and herbivores, and there being production of substances of biotechnological interest (AZEVEDO et al., 2002). Metabolites production by endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from the leaves of the *Cynodon dactylon* forage. This produced two new metabolites, asperfumoide and asperfumina, and other compounds, fumigaclavina C, fumitremorgina C, fisciona and helvólico acid, which inhibited the growth of *Candida albicans* (LIU et al., 2004).

Few studies have reported the isolation of endophytic fungi of forage of the genus *Cynodon*. Thus, studies involving the isolation and characterization of

endophytic fungi associated with *Cynodon* species are important and these studies may contribute to the selection of endophytic fungi that have interesting features and future associations with species of this genus. In Brazil there is no work or groups involved with the isolation of endophytic fungi of this forage grass.

This study aims to isolate and identify endophytic fungi isolated from different species and cultivars of the genus *Cynodon*, as well as evaluate their antifungal potential against plant phytopathogens.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Sample collection of plants of *Cynodon*

Were collected 11 specimens of plants of different species, cultivars and accessions of *Cynodon* (Table 1).

Table 1 Number of samples of cultivars and accessions of *Cynodon* collected in a greenhouse

Samples	Nº
Access EGL13 (<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>)	1
Access EGL17 (<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>)	1
Florona (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)	2
Jiggs (<i>Cynodon</i> sp.)	1
Tifton 85 (<i>Cynodon</i> sp.)	2
Florakirk (<i>Cynodon dactylon</i>)	2
Porto Rico (<i>Cynodon</i> sp.)	1
Branca (<i>Cynodon</i> sp.)	1

The samples were from a greenhouse at Embrapa Dairy Cattle - CNPGL (Juiz de Fora-MG), collected during the rainy season in the months of January and May.

The plants sampled were free of disease symptoms and collection was taken closer to substrate with pruning shears. Subsequently, were placed in plastic bags and then taken to the laboratory (BIOGEN) for the isolation of endophytic fungi, which was carried out from the stem of the plants.

2.2 Isolation of endophytic fungi from plants of *Cynodon*

Samples of collected grasses were washed in tap water, and then 10 cm stem pieces were placed in 50mL Falcon type sterile tubes for disinfection of epiphytic microorganisms. First, the stem pieces were placed in tubes containing sterile distilled water (1 min), then were transferred into tubes with 96% ethanol (2 min), followed by tubes with sterile distilled water (1 min), 5% sodium hypochlorite (2min) and sterile distilled water (1 min.). An aliquot of 0,1 ml of this water was plated on a Petri plate containing PDA/cefotaxime being used as a control. Subsequently, the stem pieces were dried in sterile filter paper and cut into small pieces (0,5 cm) using sterile scalpel. Fifteen pieces of the stem were seeded into each petri dish containing PDA/Cefotaxime culture medium and stored at 25°C in BOD. Daily examination was done to assess the presence of fungal colonies and bacterial contaminants. The endophytic fungi were transferred individually to new plates containing PDA/cefotaxime medium. The entire procedure was performed in a laminar flow and surgical glove. There are changes in procedures concerning the percentage of ethanol and sodium hypochlorite and its duration, which were 70% for 2 min and 2% for 3 min, respectively; OMA medium was used without antibiotics and incubated at 28°C (adapted from KELEMU et al., 1996).

Fragments of 3-4mm from the mycelium of endophytic fungi grown on PDA were stored in sterile eppendorf containing 1 mL of sterile distilled water and kept at 4°C (CASTELLANI, 1967).

2.3 Molecular identification, DNA amplification and sequencing

The molecular identification of fungal isolates was performed using sequences of ITS and 18S regions. Fungi were cultured on PDA and mycelium was scraped with a sterile toothpick. The extraction of total DNA was performed according the "Mobio" UltraClean ® Microbial -Kit amplification reactions were performed in a volume of 30µL, containing 15µL of the Quiagen kit, 12µL H₂O, 1µL *primer* F, 1µL *primer* R, 1µL for DNA ITS and 18S regions. The amplification parameters were specific for each pair of "*primer*" used. *Primers* used for amplification of the ITS region were ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG') and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) under the conditions of: 95°C 2min, 95°C 1min, 50°C 1 min, 72°C 1 min and 72°C 7 min, programmed for 35 cycles. *Primers* used for amplification of the 18S region were NS1(GTAGTCATATGCTTGTCTC) and NS6 (GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC) under the conditions of: 94°C 1 min, 94°C 35seg, 50seg 55°C, 72°C 2min and 72°C 6 min, programmed for 35 cycles. The amplifications were performed in a thermocycler "Programmable Thermal Controller-100 MJ Research, Inc.".

The amplification product were sent to Macrogen to be purified and sequenced. The sequences were analyzed with the aid of the SeqAssem 07/2008 program and alignment with other sequences available in the "GenBank" database was made by the program MEGA 6.

2.4 Antifungal activity of isolated endophytic fungi on phytopathogens

The phytopathogenic fungi usedwere: *Bipolaris* sp. isolated from *B. brizantha* cv. Piatã, *Fusarium verticillioides* (CML 766, 2006) unspecified host,

Sclerotinia sclerotiorum isolated from bean and *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from coffee.

A small fragment of mycelium of endophytic fungi isolated from previously grown forage plants were placed on one side of the Petri plate containing PDA and incubated for 7 days at 25°C in BOD. After these 7 days, a 3 to 5 mm diameter fragment of phytopathogenic fungus colony growth was inoculated on the opposite side of each plate containing the endophytic fungus. The plate was incubated at 25°C in BOD for 7 more days to verify possible inhibition of the plant phytopathogenic fungus by the endophytic. An adaptation of the procedure relating to the time of incubation of the plates was for fifteen days and not seven days as in this work was taken (adapted from KELEMU, et al., 2001). The endophytic fungi that inhibited growth of phytopathogen in the first test were inoculated onto Petri dishes with the partition along with the phytopathogens to verify that inhibition was due to the presence of volatile compounds or compounds secreted by the endophytic fungi in the culture medium. If the inhibition of the phytopathogen occurs in the partition plates, it can be concluded that(s) compound(s) produced(s) by the endophytic fungus is volatile.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Isolation and molecular identification of endophytic fungi

A total of 24 endophytic fungi were isolated from *Cynodon* cultivars, with 33.33% of the isolates from G.E Puerto Rico cultivar, 16.65% of Tifton 85 cultivar, 16.65% of Jiggs cultivar, Florakirk 8.33% cultivar, 4.17% of cultivating G.E Branca and Florona. Of EGL13 and EGL17 accessions were 8.33% for each (Table 2).

Table 2 Number of endophytic fungi isolated from *Cynodon* cultivars

Identification	Cultivars/Species
1/JFER1	G.E. Porto Rico (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
2/JFER2	G.E. Porto Rico (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
3/JFER3	G.E. Porto Rico (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
4/JFER4	G.E. Porto Rico (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
5/JFER4	G.E. Porto Rico (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
6/JFER6	G.E. Porto Rico (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
7/JFER7	G.E. Porto Rico (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
8/JFER8	G.E. Porto Rico (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
9/JFER9	Tifton 85 (<i>Cynodon</i> sp.)
10/JFER10	Tifton 85 (<i>Cynodon</i> sp.)
46/JFER15	Tifton 85 (<i>Cynodon</i> sp.)
11/JFER11	Tifton 85 (<i>Cynodon</i> sp.)
12/JFER12	Florakirk (<i>Cynodon dactylon</i>)
13/JFER13	Florakirk (<i>Cynodon dactylon</i>)
15/JFER1.2	Jiggs (<i>Cynodon dactylon</i>)
16/JFER1.3	Jiggs (<i>Cynodon dactylon</i>)
17/JFER2.1	Jiggs (<i>Cynodon dactylon</i>)
18/JFER2.2	Jiggs (<i>Cynodon dactylon</i>)
14/JFER14	G.E. Branca (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
45/JFERF11	Florona (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
44/EGLT3.1	Acesso EGL13 (<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>)
49/EGLT3.2	Acesso EGL13(<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>)
43/EGLD4.1	Acesso EGL17(<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>)
70/EGLD5.1	Acesso EGL17 (<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>)

For molecular identification, the genus/species of endophytic fungi was suggested according to utmost reliability in the deposited sequences. Was identified 1endophytic fungus at the family level, 11 at the genus level, 10 at the species level and 2 were not identified (Table 3).

Table3 Molecular identification of endophytic fungi through the regions ITS and 18S of genus *Cynodon*

Endophytic fungi isolated	ITS	18S	Identification genus/species
1/JFER1	<i>Sarocladium spinificis</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium spinificis</i>
2/JFER2	<i>Sarocladium</i> sp.	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium</i> sp.
3/JFER3	<i>Sarocladium spinificis</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium spinificis</i>
4/JFER4	<i>Sarocladium spinificis</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium spinificis</i>
5/JFER4	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>
6/JFER6	<i>Sarocladium spinificis</i>	<i>Sarocladium</i> sp.	<i>Sarocladium spinificis</i>
7/JFER7	<i>Sarocladium spinificis</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium spinificis</i>
8/JFER8	<i>Sarocladium spinificis</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium spinificis</i>
9/JFER9	-	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	Phaeosphaeriaceae
10/JFER10	<i>Neosetophoma</i> sp.	<i>Paraleptosphaeria dryadis</i>	<i>Neosetophoma</i> sp.
11/JFER11	<i>Neosetophoma</i> sp.	<i>Paraleptosphaeria dryadis</i>	<i>Neosetophoma</i> sp.
12/JFER12	<i>Neosetophoma</i> sp.	<i>Paraleptosphaeria dryadis</i>	<i>Neosetophoma</i> sp.
13/JFER13	<i>Neosetophoma</i> sp.	<i>Paraleptosphaeria dryadis</i>	<i>Neosetophoma</i> sp.
14/JFER14	<i>Sarocladium spinificis</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium spinificis</i>
15/JFER1.2	<i>Neosetophoma</i> sp.	<i>Paraleptosphaeria dryadis</i>	<i>Neosetophoma</i> sp.
16/JFER1.3	<i>Neosetophoma</i> sp.	<i>Paraleptosphaeria dryadis</i>	<i>Neosetophoma</i> sp.
17/JFER2.1	<i>Neosetophoma</i> sp.	<i>Wojnowicia hirta</i>	<i>Neosetophoma</i> sp.
18/JFER2.2	<i>Neosetophoma</i> sp.	<i>Paraleptosphaeria dryadis</i>	<i>Neosetophoma</i> sp.
43/EGLD4.1	-	-	Não identificado
44/EGLT3.1	<i>Pyrenochaetopsis</i> sp.	<i>Pyrenochaeta</i> sp.	<i>Pyrenochaetopsis</i> sp.
45/JFERF11	<i>Sarocladium spinificis</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium spinificis</i>
46/JFER15	<i>Neosetophoma</i> sp.	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	<i>Neosetophoma</i> sp.
49/EGLT3.2	<i>Phoma sorghina</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma sorghina</i>
70/EGLD5.1	Não identificado	Não identificado	Não identificado

The non identification of two isolates as well as the genus/species occurred due to some nucleotide sequences amplified by *primers* have shown low nucleotide identity with sequences deposited in the database.

The isolated endophytic fungi belong to the phylum *Ascomycota*. It was shown in the work of Leite (2010) with the isolation of endophytic soy fungi, that most fungi belong to the phylum *Ascomycota* and some representatives *Basidiomycota*.

The fungi genera *Neosetophoma* and *Sarocladium* were found in greater numbers in samples of *Cynodon*. In the cultivar G.E Puerto Rico 8 fungi of the genus *Sarocladium* and 6 species of *S. spinificis* were isolated. This fungus species was also isolated in G.E Branca and Florona cultivars. In Tifton 85 cultivars 3 endophytic fungi of the genus *Neosetophoma* and 1 of the Phaeosphaeriaceae family were isolated.

All 4 endophytic fungi isolated from Jiggs cultivar and 2 isolates of the Florakirk cultivar belong the genus *Neosetophoma*. InEGL13 and EGL17 access and 2 endophytic fungi were isolated in each, with EGL13 access the fungus *Phoma sorghina* was isolated and the other was not identified by the *primers* used, and access EGL17 was isolated fungus genus *Pyrenochaetopsis* and the other was not identified by *primer* sequence used. Since the genus *Sarocladium* was the most frequently found, this can be very important for this plant. Another important factor for this event, is that the samples were collected in the greenhouse, where the interference from the environment/location where the plant is located is critical to diversity. Its is supposed that the fungi found in the samples were already present on the plant or may have come from the substrate on which they were grown. Maki (2006) and Assunção (2010) reported that soil physical and chemical characteristics, and environmental and biological conditions affect the diversity of endophytic fungi. This is because the environment in which the plant is adapted will determine what kind of organism

can associate to that plant. Few fungal diseases have been reported in cultivars planted in Brazil (GONÇALVES, VIEIRA and NECHET, 2009). The fungus *Rhizoctonia solani* is responsible for leaf blight in *Cynodon*. This fungus has not been isolated as endophytic in this grass.

The genus *Sarocladium* has been described based on the morphological characteristics of *Acremonium* isolates (GAMS and HAWKSWORTH, 1976). In 2011, *Sarocladium* was extended to include seven species previously placed in *Acremonium*, according to phylogenetic analysis based on the LSU rDNA sequences, including *S. strictum*, *S. kiliense* and *S. zae*. *Sarocladium* species are often associated with grass saprobes, parasites and mutualist (SUMMERBELL et al., 2011). Recently the species *S. spinificis* was isolated as endophytic of *Spinifex littoreus* grass (YEH and KIRSCHNER, 2014), which was collected on the coast of Taiwan. This grass grows on beaches and dunes, for its propagation it produces rhizomes and vertical and horizontal stolons. Because of this characteristic, the plant of this species contributes to the formation of dunes (MAUN, 2009).

The *Neosetophoma* and *Pyrenochaetopsis* genera have been described to regroup some species previously described as a *Phoma*. The genus *Pyrenochaetopsis* includes species that were previously described in *Phoma* and *Pyrenochaeta*. They are found in soil and mainly associated with grasses (WOUDENBERG et al., 2010). The new genus *Neosetophoma* having as type species *Neosetophoma samarorum*, formerly *Phoma samarorum*, was reallocated based on morphological and molecular phylogeny, being isolated as a pathogen of plants *Urtica dioica* and *Phlox paniculata* (QUAEDVLIEG et al., 2013; GRUYTER et al., 2010, AVESKAMP et al., 2009). Since isolates of this genus were obtained in the samples, they are not pathogenic for this plant because they were healthy. Isolates probably are not of the species *N. samarorum*.

The *Phoma sorghina* species is common in tropical and subtropical regions, and has been linked to diseases in cereals such as sorghum and wheat and forage grasses (PERELLÓ and MORENO, 2005). However, *P. sorghina* was isolated from the medicinal plant *Tithonia diversifolia* producing three new anthraquinones (1,7-dihydroxy-3-methyl-9,10-anthraquinone; 1,6-dihydroxy-3-methyl-9,10-anthraquinone and 1-hydroxy-3-methyl-9,10-anthraquinone), which are known to have antimicrobial function and fight colon cancer and leukemia (BORGES and PUPO, 2006). The endophytic fungi isolated from *P. sorghina* and *Cynodon* can produce compounds to be employed in agriculture and medicine. Studies with these isolates will be carried out, because of the importance of the substances they produce.

Variou questions regarding the identification and characterization of endophytic fungi isolated from samples of *Cynodon* can not yet be answered, but our findings generate important information that can be complemented in new work.

3.2 Antifungal activity of endophytic fungi

In vitro tests showed that 24 isolates of endophytic fungi, cultivars and accessions of *Cynodon*, 9 showed potential inhibition (6 G.E Puerto Rico, 1 G.E Branca, 1 Florona and 1 EGL17) the growth of the plant phytopathogenic fungus *S. sclerotiorum*, and 7 are the *Sarocladium spinificis* species, 1 *Sarocladium* sp. and 1 could not be identified (Table 4). There no antifungal activity was observed against isolates of *Bipolaris* sp., *Fusarium verticillioides* and *Colletotrichum gloeosporioides*.

The literature studies involving *Trichoderma* spp. isolated from soil as isolates from mycology collection of the Laboratory of Plant Pathology UFMS/RS (*T.harzianum*, *T. koningiopsi*, *T. harzianum* and *T. aureoviride*),

which inhibited the growth of *S. sclerotiorum* by means of the synthesized compounds culture, which were not identified (SANTOS et al., 2012; LOUZADA et al., 2009), as well as inhibition by essential oils of plants *Cymbopogon citratus*, *Salvia officinalis* and *Bacchari strimera*, which can occur either by direct antimicrobial activity, as by activating defense mechanisms of plants (PANSERA et al., 2012).

Table 4 Endophytic fungi isolated from *Cynodon* with action in inhibiting the growth of *S.sclerotiorum*

FUNGI ENDOPHYTIC	CULTIVAR/ SPECIES
<i>Sarocladium spinificis</i>	G.E Porto Rico (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
<i>Sarocladium sp.</i>	G.E Porto Rico (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
<i>Sarocladium spinificis</i>	G.E Porto Rico (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
<i>Sarocladium spinificis</i>	G.E Porto Rico (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
<i>Sarocladium spinificis</i>	G.E Porto Rico (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
<i>Sarocladium spinificis</i>	G.E Porto Rico (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
<i>Sarocladium spinificis</i>	G.E Branca (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)
Unidentified	Access EGL17(<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>)
<i>Sarocladium spinificis</i>	Florona (<i>Cynodon nlemfuensis</i>)

This is the first study involving the endophytic fungi *S. spinificis* as antagonist to the fungus *S. sclerotiorum*. *Sarocladium* species have important applications such as *S. oryzae*, that produces antibiotics and *S. zaeae* which is considered an endophyte of corn-protecting it against herbivory (TSCHEN et al., 1997; BILLS, PLATAS and GAWS, 2004). A strain of *S. kiliense* was isolated from the gut of *Apriona germari* in Jiangsu province, China. The fractionation of the extract of EtOH *S. kiliense* cultivated in rice by a combination of chromatographic methods led to the isolation of three similar lasiodiplodina: (3S), (6R)-6-hydroxylasiodiplodina, (3R)-lasiodiplodina (3R), (5S)-5-

hydroxylasiodiplodina. Analogs Lasiodiplodina effectively inhibit prostaglandin biosynthesis, and has antileukemic and antimicrobial activities (YUAN et al., 2013).

Growth inhibition of *S. sclerotiorum* by endophytic fungi was probably a result of the synthesis of molecule(s) synthesized(s) in the culture medium, since no inhibition was observed when these fungi were grown on plates split fungus when challenged against phytopathogenic endophytic split into sclerotia plate had a structure that is unfavorable to resistance to fungal growth environment and when it was in no partition plates showed no sclerotia.

Studies will be conducted to the characterization of compounds produced by endophytic fungi isolated with inhibitory potential in this work to confirm there producing substance(s) inhibitory(s) produced.

4 CONCLUSION

The fungal isolates belong to the phylum *Ascomycota*. The genus *Sarocladium* showed a higher number of isolates, followed by the genus *Neosetophoma*. Of the fungal isolates, nine showed antifungal activity against *S. sclerotiorum*, of the genus *Sarocladium* and the species *S. spinificis*. The compound(s) which inhibited the plant phytopathogenic fungus was synthesized in the culture medium.

REFERENCES

ASSUNÇÃO, M.M.C. **Fungos endófitos isolados de folhas de bananeira (*Musa spp.*) e seleção de antagonistas a fitopatógenos dessa cultura.** 2010. 172 f. Tese (Doutorado em Biologia de fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

AVESKAMP, M.M.; VERKLEY, G.J.M.; GRUYTER, J.; MURACE, M.A.; PERELLO, A.; GROENEWALD, J.Z.; WOUDEBERG, J.H.C.; CROUS, P.W. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section Peyronellaea and multiple taxonomic novelties. **Mycologia**, v. 101, n. 3, p. 363–382, 2009.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. *In*: SERAFINI, L.A.; DE BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**, Caxias do Sul: EDUCS, 2002, p.131-163.

BILLS, G.F.; PLATAS, G.; GAMS, W. Conspicificity of the cerulenin and helvolic acid producing ‘*Cephalosporium caerulens*’, and the hypocrealean fungus *Sarocladium oryzae*. **Mycological Research**.108, p. 1291–1300, 2004.

BORGES, W.S.; PUPO, M.T. Novel Anthraquinone Derivatives Produced by *Phoma sorghina*, an Endophyte Found in Association with the Medicinal Plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). **Journal of the Brazilian**, v. 17, n. 5, p. 929 - 934, 2006.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. Further Researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p.181-184, 1967.

GAMS, W.; HAWKSWORTH, D.L. The identity of *Acrocylindrium oryzae* Sawada and a similar fungus causing sheath rot of rice. **Kavaka**, v. 3, p. 7–61, 1976.

GONÇALVES, R.C.; VIEIRA, B.A.H.; NECHET, K.L. Primeiro Registro Da Queima Foliar De *Cynodon nlemfuensis* Var. *nlemfuensis* Causada Por *Rhizoctonia Solani* Em Rio Branco, Acre. **Ci. & Desenv.**, Belém, v. 4, n. 8, 2009.

GRUYTER, J.; WOUDEBERG, J.H.C.; AVESKAMP, M.M.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. **Mycologia**, v. 102, n. 5, p. 1066–1081, 2010.

KELEMU, S.; BADEL, J.L.; MORENO, C.X.; MILES, J.W. Virulence spectrum of South American isolates of *Colletotrichum gloesporioides* on selected *Sylosanthes guianensis* genotypes. **Plant Disease**, p. 1355-1358, 1996.

KELEMU, S.; WHITE JÚNIOR, J.F.W.; MUÑOZ, F.; TAKAYAMA, Y. 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, p. 55–62, 2001.

LEITE, T.S. **Diversidade de fungos endofíticos de folhas de soja (*Glycine max*) cultivada em Viçosa – MG**. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

LIMA, J.A.; VILELA, D. Formação e manejo de pastagens de *Cynodon*. In: VILELA, D.; RESENDE, J.C.; LIMA, J. ***Cynodon*: Forrageiras que estão revolucionando a pecuária brasileira**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005.p. 11 - 32.

LIU, J.Y.; SONG, Y.C.; ZHANG, Z.; WANG, L.; GUO, Z.J.; ZOU, W.X.; TAN, R.X. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 114, p.279-287, 2004.

LOUZADA, G.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L.M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, v.9, n.3, 2009.

MAKI, C.S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau**. 2006. 127 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

MAUN, M.A. **The biology of coastal sand dunes**. New York: Oxford University Press, 2009.

PANSERA, M. R.; VICENÇO, C. B.; PRANCUTTI, A.; SARTORI, V. C.; RIBEIRO, R.T. S. Controle alternativo do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) De Bary causador da podridão de sclerotinia, com óleos essenciais e extratos vegetais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 7, n.3, p. 126-133, 2012.

PEDREIRA, C.G.S. Capins do gênero *Cynodon*: histórico e potencial para a pecuária brasileira. In: VILELA, D.; RESENDE, J.C.; LIMA, J. **Cynodon: Forrageiras que estão revolucionando a pecuária brasileira**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005, p. 35 - 38 .

PEREIRA, A.V.; SOUZA SOBRINHO, F.; SOUZA, F.H.D.; LEDO, F.J.S. Tendências do melhoramento genético e produção de sementes forrageiras no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 7., 2003, Lavras. **Anais....Lavras: UFLA/GEN**, 2003, p. 36-63.

PERELLÓ, A.E.; MORENO, M.V. First report of *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema Dorenbosch & van Kest on wheat leaves (*Triticum aestivum* L.) in Argentina. **Mycopathologia**, v. 159, p. 75–78, 2005.

QUAEDVLIEG, W.; VERKLEY, G.J.M.; SHIN, H.-D.; BARRETO, R.W.; ALFENAS, A.C.; SWART, W.J.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Sizing up *Septoria*. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 307–390, 2013.

QUEIROZ, D.S.; FONSECA, D.M.; MOREIRA, L.M. Importância do manejo do pastejo sobre a persistência e a sustentabilidade da pastagem. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 26, n. 226, p. 54-64, 2005.

SANTOS, R.F.; HECKLER, L.I.; SILVA, G.B.P. SCHEEREN, L.E.; FÍNGER, G.; MULLER, J.; DURIGON, M.R.; BLUME, E. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. contra isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Anais...SIMPÓSIO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO: APRENDER E EMPREENDER NA EDUCAÇÃO E NA CIÊNCIA.** v. 3, 2012.

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.

TSCHEN, JS-M.; CHEN, L-L.; HSIEH, S-T.; WU, T-S. Isolation and phytotoxic effect of helvolic acid from plant pathogenic fungus *Sarocladium oryzae*. **Botanical Bulletin Academia Sinica**, v. 38, p. 251–256, 1997.

WOUDEBERG, J. H.C.; AVESKAMP, M. M.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. **Mycologia**, v.102, n. 5, p. 1066–1081, 2010.

YEH, Y-H.; KIRSCHNER, R. *Sarocladium spinificis*, a new endophytic species from the coastal grass *Spinifex littoreus* in Taiwan. **Botanical Studies**, v. 55, n.25, p. 2 – 6, 2014.

YUAN, W,H.;JIANG,N.;DONG,C.H.;WEI, Z.W.; WU, H.K.; CHEN, C.F.; ZHAO, Y.X.; ZHOU, S.L.; ZHANG,M.M.; ZHENG, W.F. Lasiodiplodin Analogues from the Endophytic Fungus *Sarocladium Kiliense*. **Chemical of Pharmaceutical Bulletin**,v.61, n. 3, p. 363–365, 2013.