



**NATÁLIE MARTINS ALVES**

***Paraconiothyrium*: IDENTIFICATION, BIOLOGICAL  
CONTROL AND TROPICAL FORAGE GRASS  
PERFORMANCE**

**LAVRAS - MG  
2018**

**NATÁLIE MARTINS ALVES**

***Paraconiothyrium*: IDENTIFICATION, BIOLOGICAL CONTROL AND TROPICAL  
FORAGE GRASS PERFORMANCE**

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

Profa. Dra. Patrícia Gomes Cardoso  
Orientadora

Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pela própria autora.

Alves, Natálie Martins.

*Paraconiothyrium*: identification, biological control and  
tropical forage grass performance / Natálie Martins Alves. - 2018.  
80 p.

Orientadora: Patrícia Gomes Cardoso.

Coorientador: Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Controle biológico. 2. Germinação de sementes. 3.  
Taxonomia molecular. I. Cardoso, Patrícia Gomes. II. de Medeiros,  
Flávio Henrique Vasconcelos. III. Título.

**NATÁLIE MARTINS ALVES**

***Paraconiothyrium*: IDENTIFICATION, BIOLOGICAL CONTROL AND TROPICAL  
FORAGE GRASS PERFORMANCE**

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

APROVADA em 16 de março de 2018.

Dra. Liana Jank EMBRAPA GADO DE CORTE

Dr. Henrique Monteiro Ferro BIOVALENS LTDA.

Dr. Ulisses José de Figueiredo BARENBRUG DO BRASIL SEMENTES LTDA.

Profa. Dra. Patrícia Gomes Cardoso  
Orientadora

Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2018**

A meus pais pelo amor e doação sem medidas e por fazerem de mim o que sou hoje, e à minha Vozinha Natália (*in memoriam*) por me ensinar, no alto de toda sua simplicidade e humildade, o que é ser um exemplo de mulher forte e guerreira

**DEDICO e OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus e à Nossa Senhora pela força, Fé (que me segurou) e vitória conquistada.

A todos os meus familiares, em especial, Paizinho, Mãezinha e Pri pela compreensão, amor, dedicação, doação, força, carinho e fé em todos os momentos de minha vida, e que me ensinaram a amar e respeitar o próximo, valorizar cada momento da vida, principalmente os mais simples, e as grandes amizades conquistadas. Vocês são minha base e meu tudo!

Ao meu namorado Lucas por toda paciência, companherismo, dedicação e amor.

À Professora Dra. Patrícia Gomes Cardoso, minha orientadora por todos esses anos, pelo incentivo, orientação segura, ensinamentos, amizade, confiança e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros, meu coorientador, por toda ajuda, orientação, incentivo, amizade, sugestões e colaboração.

Aos pesquisadores Dra. Liana Jank, Dr. Henrique Monteiro Ferro e Dr. Ulisses José de Figueiredo por toda contribuição, sugestões, elogios e participação na banca examinadora.

A todos os amigos do Laboratório de Bioprospecção e Genética de Fungos Filamentosos (BIOGEN), em especial à Babi (Amigaaa pra vida), Mônica, Dérica e Ítalo, e também a todos os meus estagiários que passaram comigo desde o início, até agora no final, sem vocês eu não chegaria até aqui. Deixo aqui, também, meu agradecimento ao BIOMA (Núcleo de estudos em Bioprospecção e Microbiologia Aplicada), tenho muito orgulho de ter sido um dos membros fundadores, e ter contribuído, pelo menos um pouco, para o seu crescimento.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Biologia - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Aos professores do Departamento de Biologia - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos adquiridos durante o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo (pelo menos, parte dela, rs, mas não por culpa própria).

E a todos que diretamente ou indiretamente, contribuíram para a elaboração e realização deste trabalho/sonho.

**Muito obrigada**

## EPÍGRAFE

“Sabe tese, de faculdade? Aquela que defendem? Com unhas e dentes? É dessa tese que eu estou falando. Você deve conhecer pelo menos uma pessoa que já defendeu uma tese. Ou esteja defendendo. Sim, uma tese é defendida. Ela é feita para ser atacada pela banca, que são aquelas pessoas que gostam de botar banca (pelo menos alguns). As teses são todas maravilhosas. Em tese. Você acompanha uma pessoa meses, anos, séculos, defendendo uma tese. Palpitantes assuntos. Tem tese que não acaba nunca, que acompanha o elemento para a velhice. Tem até teses pós-morte. O mais interessante na tese é que, quando nos contam, são maravilhosas, intrigantes. A gente fica curiosa, acompanha o sofrimento do autor, anos a fio. Aí ele publica, te dá uma cópia e é sempre - sempre - uma decepção. Em tese. Impossível ler uma tese de cabo a rabo. São chatíssimas. É uma pena que as teses sejam escritas apenas para o julgamento da banca circumspecta, sisuda e compenetrada em si mesma. E nós? Sim, porque os assuntos, já disse, são maravilhosos, cativantes, as pessoas são inteligentíssimas. Temas do arco-da-velha. Mas toda tese fica no rodapé da história. Pra que tanto sic e tanto apud? Sic me lembra do Pasquim e apud não parece candidato do PFL para vereador? Apud Neto. Escrever uma tese é quase um voto de pobreza que a pessoa se autodecreta. O mundo pára, o dinheiro entra apertado, os filhos são abandonados, o marido que se vire. Estou acabando a tese. Essa frase significa que a pessoa vai sair do mundo. Não por alguns dias, mas anos. Tem gente que nunca mais volta. E, depois de terminada a tese, tem a revisão da tese, depois tem a defesa da tese. E, depois da defesa, tem a publicação. E, é claro, intelectual que se preze, logo em seguida embarca noutra tese. São os profissionais, em tese. O pior é quando convidam a gente para assistir à defesa. Meu Deus, que sono. Não em tese, na prática mesmo. Orientados e orientandos (que nomes atuais!) são unânimes em afirmar que toda tese tem de ser - tem de ser! - daquele jeito. É pra não entender, mesmo. Tem de ser formatada assim. Que na Sorbonne é assim, que em Coimbra também. Na Sorbonne, desde 1257. Em Coimbra, mais moderna, desde 1290. Em tese (e na prática) são 700 anos de muita tese e pouca prática. Acho que, nas teses, tinha de ter uma norma em que, além da tese, o elemento teria de fazer também uma tesão (tese grande). Ou seja, uma versão para nós, pobres teóricos ignorantes que não votamos no Apud Neto. Ou seja, o elemento (ou a elementa) passa a vida a estudar um assunto que nos interessa em nada. Pra quê? Pra virar mestre, doutor? E daí? Se ele estudou tanto aquilo, acho impossível que ele não queira que a gente saiba a que conclusões chegaram. Mas jamais saberemos onde fica o bicho da goiaba quando não é tempo de goiaba. No bolso do Apud Neto? Tem gente que vai para os Estados Unidos, para a Europa, para terminar a

tese. Vão lá nas fontes. Descubrem maravilhas. E a gente não fica sabendo de nada. Só aqueles sisudos da banca. E o cara dá logo um dez com louvor. Louvor para quem? Que exaltação, que encômio é isso? E tem mais: as bolsas para os que defendem as teses são uma pobreza. Têm viagens, compra de livros caros, horas na Internet da vida, separações, pensão para os filhos que a mulher levou embora. É, defender uma tese é mesmo um voto de pobreza, já diria São Francisco de Assis. Em tese. Tenho um casal de amigos que há uns dez anos preparam suas teses. Cada um, uma. Dia desses a filha, de 10 anos, no café da manhã, ameaçou: - Não vou mais estudar! Não vou mais à escola. Os dois pararam - momentaneamente - de pensar nas teses. - O quê? Pirou? - Quero estudar mais, não. Olha vocês dois. Não fazem mais nada na vida. É só a tese, a tese, a tese. Não pode comprar bicicleta por causa da tese. A gente não pode ir para a praia por causa da tese. Tudo é pra quando acabar a tese. Até trocar o pano do sofá. Se eu estudar vou acabar numa tese. Quero estudar mais, não. Não me deixam nem mexer mais no computador. Vocês acham mesmo que eu vou deletar a tese de vocês? Pensando bem, até que não é uma má ideia! Quando é que alguém vai ter a prática ideia de escrever uma tese sobre a tese? Ou outra sobre a vida nos rodapés da história? Acho que seria um tesão.”

"UMA TESE É UMA TESE"

Mário Prata - Crônica publicada no jornal O Estado de São Paulo em 7 de outubro de 1998.

Agora sim, chegou a hora de escrever a Tese sobre minha vida, e ela no todo, não só no rodapé da minha história.



## RESUMO

Fungos endofíticos colonizam tecidos das plantas vivas, estabelecendo relações mutualísticas e também são relatados como inibidores do crescimento de fungos fitopatogênicos. Fungos do gênero *Paraconiothyrium* são considerados agentes de controle biológico e biorremediadores. Os objetivos deste estudo foram identificar fungos do gênero *Paraconiothyrium* por morfologia e utilizando diferentes marcadores moleculares, avaliar a inibição de *Sclerotinia sclerotiorum*, o parasitismo e inatividade de seus escleródios e padronizar uma técnica de inoculação de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Panicum maximum* cv. BRS Tamani usando fungos endofíticos do gênero *Paraconiothyrium*, para avaliar a germinação das sementes inoculadas e o desenvolvimento das plantas oriundas dessas sementes. Os fungos endofíticos isolados de gramíneas forrageiras foram reativados em BDA a 25°C por 15 dias. Para esporulação, foram cultivados em diferentes meios de cultura e temperaturas. A identificação molecular baseou-se nas análises das regiões ITS, LSU,  $\gamma$ -actina e  $\beta$ -tubulina. Foi realizado antagonismo *in vitro* contra *S. sclerotiorum* e subsequentemente seus escleródios foram imersos em suspensão de esporos de cada fungo endofítico e distribuídos em placas de Petri em um substrato com papel de germinação, umedecido com água destilada estéril. O teste de viabilidade destes escleródios parasitados foi realizado em meio ágar-bromofenol (NEON). Para avaliar se a diferença no potencial osmótico do meio de cultura interferiu no crescimento micelial fúngico, estes foram cultivados em meio BDA modificado com quatro concentrações diferentes de manitol (-0,6; -0,8; -1,0 e -1,2 MPa). Foi avaliada a germinação de sementes de *B. brizantha* cv. Marandu e *P. maximum* cv. BRS Tamani e o desenvolvimento das plantas oriundas dessas sementes inoculadas com fungos endofíticos do gênero *Paraconiothyrium* em condições normais e sob estresse hídrico. Os fungos foram identificados como *P. cyclothyrioides* e *P. estuarinum*. Todos os fungos inibiram o crescimento de *S. sclerotiorum*, *in vitro*, e parasitaram seus escleródios, sendo que quatro desses fungos conseguiram inviabilizar esses escleródios. O maior potencial osmótico (-1,2 MPa) foi utilizado porque não houve diferença significativa entre os diferentes potenciais testados. Houve um aumento no número de sementes germinadas, em relação ao controle, inoculadas com os fungos CML3697, CML3698 e CML3699 para *Brachiaria* e com os fungos CML3697 e CML3699 para *Panicum*. Para *Brachiaria*, houve um ganho de massa vegetal nas plantas inoculadas com fungos CML3695, CML3696 e CML3698, e para *Panicum*, nas plantas inoculadas com fungos CML3695, CML3698 e CML3699. Sob estresse hídrico, observou-se um aumento no número de sementes germinadas para ambas as forrageiras, em relação ao experimento sem estresse hídrico. Fungos endofíticos do gênero *Paraconiothyrium* apresentam potencial no controle biológico de *S. sclerotiorum*, e podem estimular a germinação de sementes forrageiras e o desenvolvimento das plantas oriundas dessas sementes inoculadas.

**Palavras-chave:** Controle biológico. Estresse hídrico. Germinação de sementes. Potencial osmótico. Sistemática molecular. Taxonomia.

## ABSTRACT

Endophytic fungi colonize living plant tissues, establishing mutualistic relationships and are also reported to be considered biological control agents and bioremediators. The aims of this study were to identify fungi of the genus *Paraconiothyrium* by morphology and using different molecular markers, to evaluate the inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum*, the parasitism and inactivity of its sclerotia and to optimize a technique of inoculation of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *Panicum maximum* cv. BRS Tamani seeds using endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* to evaluate the germination of the inoculated seeds and the development of the plants from these seeds. Endophytic fungi isolated from forage grass were reactivated in PDA at 25°C for 15 days. For sporulation, they were grown in different culture media and temperatures. Molecular identification was based on the analyzes of the ITS, LSU,  $\gamma$ -actin and  $\beta$ -tubulin regions. *In vitro* antagonism against *S. sclerotiorum* was performed and subsequently sclerotia were immersed in spore suspension of each endophytic fungus and distributed in Petri dishes on a substrate with germinating paper, moistened with sterile distilled water. The viability test of these parasitized sclerotia was performed on agar bromophenol medium (NEON). To evaluate whether the difference in the osmotic potential of the culture medium interfered with fungal mycelial growth, they were grown in modified PDA medium with four different mannitol concentrations (-0.6, -0.8, -1.0 and -1.2 MPa). It was evaluated the seeds germination of *B. brizantha* cv. Marandu and *P. maximum* cv. BRS Tamani and the development of the plants from these seeds inoculated with endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* under normal conditions and under water stress. The fungi were identified as *P. cyclothyrioides* and *P. estuarinum*. All fungi inhibited the growth of *S. sclerotiorum*, *in vitro*, and parasitized their sclerotia, and four of these fungi were able to prevent these sclerotia. The highest osmotic potential (-1.2 MPa) was used because there was no significant difference between the different potentials tested. There was an increase in the number of germinated seeds, in relation to the control, inoculated with the fungi CML3697, CML3698 and CML3699 for *Brachiaria* and with the fungi CML3697 and CML3699 for *Panicum*. For *Brachiaria*, there was a gain of plant mass in the plants inoculated with fungi CML3695, CML3696 and CML3698, and for *Panicum*, in the plants inoculated with fungi CML3695, CML3698 and CML3699. Under water stress, there was an increase in the number of germinated seeds for both grasses, in relation to the experiment without water stress. Endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* have potential in the biological control of *S. sclerotiorum*, and can stimulate the germination of forage seeds and the development of the plants from these inoculated seeds.

**Keywords:** Biological control. Hydric stress. Molecular systematics. Osmotic potential. Seed germination. Taxonomy.

## SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 JUSTIFICATIVA.....	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3.1 Fungos endofíticos.....	13
3.2 Fungos endofíticos em plantas e gramíneas.....	15
3.3 O gênero <i>Brachiaria</i> .....	16
3.4 A espécie <i>Panicum maximum</i> .....	17
3.5 O fungo fitopatogênico <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	19
3.6 O gênero <i>Paraconiothyrium</i> .....	20
3.7 Controle Biológico.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	33
ARTIGO 1 - <i>Paraconiothyrium</i> : Identification and inhibition of <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	33
ARTIGO 2 - <i>Paraconiothyrium</i> on the germination and performance of tropical grasses.....	58

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Paraconiothyrium* (Ascomycota – Dothideomycetes – Pleosporales - Montagnulaceae) foi primeiramente descrito por Verkley et al. (2004) para acomodar alguns morfos assexuados geneticamente distantes de *Coniothyrium*, agrupando-os mais perto de *Paraphaeosphaeria*. Também neste mesmo trabalho, foram descritas quatro novas espécies de *Paraconiothyrium*, *P. estuarinum*, *P. brasiliense*, *P. cyclothyrioides* e *P. fungicola*. Foram também reclassificados como pertencentes ao gênero *Paraconiothyrium* os fungos *Coniothyrium sporulosum* presente no solo e o importante agente de controle biológico *C. minitans*.

Fungos do gênero *Paraconiothyrium* são morfos assexuados de *Coelomicetos* da ordem *Pleosporales*, classe *Dothideomycetes* (Ascomycota), caracterizados por produzirem picnídios ou conidiomas eustromáticos relativamente pequenos, sub-hialinos, pigmentados, e um ou dois conídios unicelulares. A maioria das espécies foi classificada, anteriormente, nos gêneros *Coniothyrium* ou *Microsphaeropsis*. Fungos destes gêneros, são importantes agentes de controle biológico e biorremediadores, porém há relatos de serem, também, patógenos de plantas.

*Paraconiothyrium* detém atualmente 23 espécies, e apenas uma delas, *P. fuckelii*, possui a fase sexual descrita. Estas espécies vem sendo descritas, também, como endofíticas, que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízo ao seu hospedeiro, e bons agentes de controle biológico, atuando por meio de hiperparasitismo.

Neste trabalho, fungos do gênero *Paraconiothyrium*, isolados das gramíneas *Panicum maximum* e diferentes espécies de *Brachiaria*, foram identificados molecularmente e tradicionalmente, avaliados quanto ao potencial de controle biológico contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*, e avaliados frente à germinação de sementes e desenvolvimento das plantas de gramíneas forrageiras tropicais.

## 2 JUSTIFICATIVA

A biodiversidade vegetal em países de clima tropical e subtropical como o Brasil é imensa. Estima-se que cada espécie vegetal possua microrganismos endofíticos ainda não classificados, com propriedades pouco conhecidas e com potencial de aplicação em diferentes áreas. Com isso, o estudo de fungos endofíticos é de grande interesse científico e acadêmico, pois possibilita a descoberta de novas espécies de microrganismos, além do interesse aplicado visto que estes microrganismos podem conferir benefícios à planta hospedeira como resistência a condições de estresse, produção de fitohormônios, controle de fitopatógenos e pragas, atuando como agentes de controle biológico, dentre outros. Os fungos endofíticos também podem sintetizar metabólitos secundários de interesse biotecnológico. Estes produtos naturais podem inibir ou matar uma vasta variedade de agentes causadores de doenças (bactérias, fungos, vírus e protozoários) que acometem as plantas, os animais e o homem.

As plantas forrageiras são de grande importância para o Brasil. Elas ocupam uma grande área e formam a base produtiva da pecuária de corte e de leite, sendo necessário seu contínuo melhoramento visando aumentar a competitividade da pecuária nacional. Vários estudos têm sido realizados visando o melhoramento genético de espécies de *Brachiaria* e *Panicum*. Porém, pouco tem sido estudado em relação ao isolamento e caracterização de fungos endofíticos associados a essas plantas tropicais, principalmente no Brasil.

Desse modo, é interessante a caracterização dos fungos endofíticos do gênero *Paraconiothyrium*, isolados de gramíneas brasileiras *Panicum maximum* e diferentes espécies de *Brachiaria*, e avaliação da capacidade de utilização destas linhagens no controle biológico de doenças de plantas.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Fungos Endofíticos

O termo endofítico foi primeiramente introduzido por De Bary (1866) sendo aplicado a microrganismos presentes 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 endofíticas 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) São os Clavicipitaceus, frequentemente aumentam a biomassa vegetal, conferem tolerância à seca, produzem produtos químicos que são tóxicos para animais e diminuem a herbivoria; Da classe 2 à 4 são os organismos não Clavicipitaceus, 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 bioativos 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 et al., 1999; PEIXOTO et al., 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*, sendo que em apenas alguns trabalhos foi demonstrada a presença de representantes do 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). Os metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular, e são produzidos pelo microrganismo em resposta às condições ambientais. Estes metabólitos não são essenciais ao crescimento do microrganismo, mas estão envolvidos em processos de comunicação entre o microrganismo e a planta hospedeira (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).

A partir dos 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 et al., 1993). Fernandes et al. (2015) avaliaram a diversidade de fungos endofíticos em *Glycine max* e puderam concluir que a diversidade observada, cultivável, é maior nas folhas de *G. max* em relação às raízes. Por outro lado, as comunidades de fungos amostradas

pela análise de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) mostraram que a comunidade de fungos endofíticos é diferente nas raízes. Entre os fungos endofíticos isolados de *G. max*, observou-se uma alta dominância nas raízes de espécies de *Fusarium*, o que pode ser preocupante porque fungos deste gênero estão causando grandes surtos de doenças em diversas espécies de plantas. Para as espécies de fungos isoladas, descobrimos que as técnicas de identificação molecular baseadas na região ITS e a taxonomia clássica de fungos isolados são complementares e que em conjunto, essas técnicas permitem a identificação precisa de fungos endofíticos.

### 3.2 Fungos endofíticos em plantas forrageiras

Muitas espécies de fungos endofíticos são encontradas nas plantas. Esses fungos estão presentes no interior das folhas, colmos e órgãos reprodutivos das plantas hospedeiras. Webber (1981) isolou *Phomopsis oblonga* de plantas de olmeiro que protegia a planta de besouros da espécie *Physocnemum brevilineum*. Essa proteção evitava a transmissão de fitopatógenos, pois o inseto atuava como vetor do fungo *Ceratocystis ulmi* que causa doença em olmeiro. Quatro anos mais tarde, Claydon et al. (1985) comprovaram que o efeito no inseto-praga era de um composto tóxico produzido pelo fungo endofítico. Também mostraram que endofíticos da família *Xylariaceae* são produtores de metabólitos secundários e controlam larvas de besouro, em hospedeiros vegetais do gênero *Fagus*. O fungo endofítico *Acremonium* sp. isolado da gramínea *Festuca* reduziu o ataque dos insetos *Spodoptera frugiperda* e *S. eridana* (BREEN, 1993). O extrato do fungo endofítico *Muscodor vitigenus*, isolado da planta *Paullinia paullinioides* forneceu um novo diterpeno, o ácido nodulispórico que apresentou potente propriedade inseticida contra larvas de moscas (DAISY et al., 2002).

Diversas cultivares de gramíneas forrageiras de regiões temperadas são infectadas pelos fungos endofíticos *Epichloë* e *Neotyphodium*, e a transmissão vertical destes endofíticos tem permitido a produção de sementes infectadas em escala comercial. Essas cultivares infectadas com *Neotyphodium* e *Epichloë* mostraram aumento da resistência a herbívoros, agentes patogênicos de plantas, e a algumas condições de estresse abiótico. O uso de tais cultivares pode resultar em uma redução na utilização de inseticidas e fungicidas (BRILMAN, 2005). Algumas espécies pertencentes a estes gêneros possuem a capacidade de produzirem compostos como peramine, lolitrem B, loline e ergovalina que podem atuar na redução de herbívoros (SCHARDL et al., 2013).



*Acremonium implicatum* foi isolado de *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens* CIAT 606 e *B. arrecta* CIAT 16845 (KELEMU et al., 2000). Em níveis moderados de estresse, a presença de *Acremonium implicatum* não teve efeito significativo sobre o crescimento de *B. arrecta* CIAT 16845, mas, sob estresse hídrico severo, plantas infectadas com o endofítico mantiveram melhor expansão foliar e produziram significativamente maior biomassa foliar do que as plantas livres do fungo endofítico. Na inibição *in vivo*, utilizando as plantas infectadas com o mesmo fungo endofítico frente ao fungo patogênico *Drechslera* sp., foram observadas lesões foliares menores e mais pontuais e redução significativa da esporulação do patógeno (KELEMU et al., 2001). Um par de *primers* foi descrito para a detecção rápida e confiável de *A. implicatum* em tecidos de *Brachiaria* (KELEMU et al., 2003).

*Acremonium zeae* isolado de grãos de milho (*Zea mays*) inibiu o crescimento dos patógenos *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* provavelmente devido a síntese 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).

### 3.3 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 brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. 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, à 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 et al., 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 190 milhões de hectares de pastagens e, o gênero *Brachiaria* ocupa cerca de 85% dessa área (ANUALPEC, 2008). A dieta de rebanhos bovinos no Brasil depende quase exclusivamente de forrageiras tropicais, que é a principal fonte de energia e nutrientes. A qualidade da forragem é o fator mais importante entre os que

influenciam a produtividade bovina, 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 agrônômicas 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 espécie *B. brizantha* difere das outras espécies em relação ao seu hábito de crescimento que é ereto e semi-ereto, indicada para sistemas silvipastoris e possui resistência as cigarrinhas-das-pastagens, principalmente a cultivar Marandu (ALVIM et al., 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 espécie *B. humidicola* é uma das poucas espécies forrageiras que se adaptam bem a solos mal drenados sujeitos a inundações e de menor fertilidade, sendo usada em condições ambientais dos campos de cerrado da Região Norte do Brasil. *B. ruziziensis* é a única espécie diplóide e sexuada, com 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 et al., 2002).

### **3.4 A espécie *Panicum maximum***

A espécie *Panicum maximum* Jacq. é originária da África tropical e tem grande importância no cenário brasileiro, sendo bem adaptada a solos profundos, bem drenados e com fertilidade do solo de média a elevada. Por essa razão, grande parte dos estudos envolvendo cultivares de forrageiras está sendo direcionado para essa espécie (VALLE et al., 2009).

Esta espécie é descrita como uma cultura perene, formadora de touceiras com sistema radicular profundo, altura variável entre 60 e 200 cm, limbos foliares verde escuro com 35 mm de largura que vão reduzindo-se para terminar em pontas finas e panículas com 12 a 40 cm de altura (SKERMAN; RIVEROS, 1992). A profundidade de seu sistema radicular varia, em condições favoráveis, de 45 a 150 cm de profundidade (MOLINARI, 1952).

Jank et al. (2014) avaliaram o valor das pastagens melhoradas para a produção brasileira de carne bovina, e observaram que desde a vinda da espécie *Panicum maximum* para o Brasil, em 1980, outras cultivares puderam ser produzidas (como Tanzânia e Mombaça) e, estas foram muito bem adotadas pelos produtores, devido à sua alta produtividade e qualidade, resultando em uma maior eficiência de pastejo, sendo bastante utilizadas até nos dias atuais. Toda coleção *Panicum maximum* foi transferida para a Embrapa em 1984 em um acordo de cooperação. A Embrapa também possui os principais bancos de germoplasma do país, sendo que a Embrapa Gado de Corte mantém os bancos de germoplasma de espécies de *Brachiaria*, *P. maximum* e espécies de *Stylosanthes*, e é responsável pelos programas de melhoramento de três espécies de *Brachiaria* (*B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. humidicola*), *P. maximum* e espécies de *Stylosanthes* (principalmente *S. capitata* e *S. macrocephala*). Os autores enfatizam que os programas de melhoramento genético de spp. *Brachiaria* e *Panicum maximum*, que têm uma história de liberação de cultivares em comparação com outros gêneros forrageiros, estão passando por uma mudança de paradigma. Até agora, o principal método de obtenção de novas cultivares era a seleção de acessos apomíticos superiores diretamente dos bancos de germoplasma, que é um processo finito em termos de identificação de genótipos superiores. Recentemente, estratégias de melhoria foram adotadas para obter híbridos superiores, tornando todo o sistema mais eficiente e infinito.

A cultivar BRS Tamani é o primeiro híbrido de *Panicum maximum* da Embrapa, resultado de um cruzamento realizado na Embrapa Gado de Corte em 1992. Apresenta como características porte baixo, com alta produção de folhas de alto valor nutritivo (elevados teores de proteína bruta e digestibilidade), produtividade e vigor, sendo de fácil manejo e resistente às cigarrinhas das pastagens. Sua alta qualidade e adaptação faz com que seja indicada para engorda de gado bovino, principalmente no bioma cerrado, sendo uma opção para diversificação de pastagens em solos bem drenados. Destacou-se também nos biomas Amazônia e Mata Atlântica, mas não é indicada para áreas sujeitas a alagamentos mesmo que temporários por apresentar baixa tolerância ao encharcamento do solo. Em condições de baixas temperaturas, apresenta maior persistência que as cvs. Massai e Tanzânia e semelhante à cv. Mombaça. Esta solução tecnológica foi desenvolvida pela Embrapa em parceria com outras instituições (EMBRAPA Gado de Corte, 2018).

### 3.5 O fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*

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 *Sclerotinia sclerotiorum*, pertencente ao filo dos Ascomycetes, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae, 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 et al., 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 temperatura 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).

### 3.6 O gênero *Paraconiothyrium*

O gênero *Paraconiothyrium* (Ascomycota – Dothideomycetes – Pleosporales – Montagnulaceae) foi primeiramente descrito em 2004, por Verkley et al. para acomodar alguns morfos assexuados geneticamente distantes de *Coniothyrium*, agrupando-os mais próximos de *Paraphaeosphaeria*. Neste trabalho, foram descritas quatro novas espécies de *Paraconiothyrium*, *Paraconiothyrium estuarinum*, *P. brasiliense*, *P. cyclothyrioides* e *P. fungicola*. E também, com base na filogenética molecular, o fungo *Coniothyrium sporulosum* presente no solo e o importante agente de controle biológico *C. minitans*, foram reclassificados como *Paraconiothyrium* (VERKLEY et al., 2014).

Fungos do gênero *Paraconiothyrium* são morfos assexuados de *Coelomycetous* da ordem *Pleosporales*, classe *Dothideomycetes* (Ascomycota), caracterizados por produzirem picnídios ou conidiomas eustromáticos relativamente pequenos, sub-hialinos, pigmentados, e um ou dois conídios unicelulares. A maioria das espécies foi classificada, anteriormente, nos gêneros *Coniothyrium* ou *Microsphaeropsis*. Fungos deste gênero, são muitas vezes de grande importância, pois são considerados eficazes agentes de controle biológico e biorremediadores. Porém, há relatos de serem, também, patógenos de plantas (VERKLEY et al., 2014). Eles também estão sendo relatados em casos clínicos onde há infecções cutâneas invasivas em pacientes imunocomprometidos ou transplantados (BALAJEE et al., 2007, GORDON et al. 2012).

A identificação molecular utilizando sequências ITS e SSU mostraram que as quatro novas espécies de *Paraconiothyrium*, descritas por Verkley et al. (2004) são parte de uma linhagem filogenética distinta dentro dos ascomicetos pleosporales.

Damm et al. (2008) descreveram mais duas novas espécies de *Paraconiothyrium*, *P. africanum* e *P. variabile*, e também transferiram *Microdiplodia hawaiiensis* para *Paraconiothyrium*. Budziszewska et al. (2011) descreveram *Parac. babiogorensis*, um endófito do musgo *Huperzia*. Com base em análises de sequência LSU, de Gruyter et al. (2012) transferiram os *Coelomycetes: Phoma* sp., *Plenodomus fusco-maculans*, *Asteromella tiliae* e *Phoma lini* para *Paraconiothyrium*, e descreveram, também, uma nova espécie, *Paraconiothyrium maculiculis*.

Estudos moleculares, centrados nos gêneros sexuados e assexuados de *Pleosporales*, demonstraram que *Coniothyrium* e *Microsphaeropsis*, e também o onipresente *celomiceto* do gênero *Phoma*, são polifiléticos, com espécies que ocorrem em vários clados da ordem

*Pleosporales*, sendo utilizadas como base sólida para redefinir as famílias (VERKLEY et al., 2004, 2013, SCHOCH et al., 2009, ZHANG et al., 2012, AVESKAMP et al. 2010, de GRUYTER et al., 2010, 2012, QUAEDVLIEG et al. 2013).

O gênero *Paraconiothyrium* apresenta 23 espécies, e apenas *P. fuckelii* possui fase sexual descrita (de GRUYTER et al., 2012). Dentre essas espécies, algumas vem sendo descritas como endofíticas e bons agentes de controle biológico, produzindo também, alguns compostos bioativos. Tan et al. (2012) fizeram o primeiro relato sobre fungos endofíticos cultiváveis isolados de raízes de plantas de *Holcoglossum* (Orchidaceae), e dentre os 46 fungos isolados, fungos do gênero *Paraconiothyrium* estavam entre os predominantes, pois 36,96% dos 46 fungos isolados eram da Classe Dothideomycetes, classe esta a que pertence esse gênero.

Khan et al. (2012) isolaram composto Brefeldina A do fungo endofítico *Paraconiothyrium* sp. Esse metabólito possui atividades bioativas importantes, incluindo propriedades antifúngicas, antivirais e anticancerígenas, e pode também ser utilizado no manejo de plantas daninhas. Resultados obtidos por Carvalho et al. (2012) indicaram o potencial antioxidante e antiproliferativo do extrato bruto da fermentação do fungo endofítico *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 isolado a partir das folhas da planta medicinal *Rheedia brasiliensis*.

No trabalho de Han et al, (2012) foi sugerido que o isolado LT161, *Paraconiothyrium brasilienses*, obtido de caules saudáveis de *Cinamonum camphora*, poderia ser promissor na produção de um composto líder para o desenvolvimento de pesticidas ou usada diretamente como agente de controle biológico no sistema de agricultura sustentável, pois o filtrado da cultura apresentou forte poder de inibição no crescimento, *in vitro*, dos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Glomerella glycines*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum* e *Cryphonectria parasítica*.

Soliman et al. (2013) compararam a quantidade de taxol produzido pelas árvores de *Taxus*, quando há um esgotamento do fungo endofítico precursor desta substância, *Paraconiothyrium* sp. SSM001. Os resultados mostraram que com a ausência do endofítico, há uma redução na acumulação de taxol, que conseqüentemente, gera reduções concomitantes na transcrição e/ou níveis de proteínas correspondentes a dois genes críticos necessários para a biossíntese de taxol pela planta. *Paraconiothyrium* sp. SSM001 foi resistente ao taxol, que apresentou uma atividade antifúngica a fungos apodrecedores de madeira de coníferas, habitat natural deste endofítico, indicando que este fungo pode desenvolver uma estratégia para prevenir a colonização de fungos fitopatogênicos a um custo metabólico mínimo para si.

Tian et al, (2014) investigaram a ação do fungo endofítico *Paraconiothyrium variable*, isolado de folhas de *Cephalotaxus harringtonia*, no metabolismo da planta hospedeira, e observaram uma biotransformação específica de flavonóides glicosilados pelo endofítico, concluindo que juntamente com o papel alelopático conhecido dos flavonóides, observa-se também, a cooperação química subjacente em relação ao mutualismo entre a planta e o endófito.

Anisha et al. (2018) analisaram o espectro de bioatividade de fungos endofíticos isolados de *Zingiber officinale* contra patógenos clínicos e contra o fitopatógeno *Pythium myriotylum*, que causa podridão de *Pythium* no gengibre. Um dos isolados (GFM13) identificado, molecularmente, como pertencente ao gênero *Paraconiothyrium*, mostrou ampla bioatividade contra vários patógenos testados, incluindo *P. myriotylum*. A suspensão de esporos, bem como o filtrado da cultura, apresentaram proteção efetiva dos rizomas do gengibre contra a podridão de *Pythium*. O composto bioativo produzido por este isolado foi separado, por fracionamento guiado por bioatividade, e identificado, por GC-MS, como Danthron, um derivado da antraquinona. Amplificação por PCR mostrou a presença de um gene não absorvente de poliquetídeo sintase (NR-PKS) no endófito GFM13, que é relatado como responsável pela síntese de antraquinonas em fungos. Danthron é relatado por ter amplas aplicações farmacêuticas e agrônômicas que incluem seu uso como um fungicida na agricultura. Este foi o primeiro relato de Danthron a ser produzido como componente biologicamente ativo de *Paraconiothyrium* sp.

Fungos do gênero *Paraconiothyrium* foram isolados endofiticamente das gramíneas tropicais *Panicum maximum* (MAIA, 2015) e de diferentes espécies de *Brachiaria* (GAMA, 2014), relatos esses, pioneiros para o isolamento deste gênero de fungo em gramíneas tropicais destas espécies.

### **3.7 Controle Biológico**

O controle biológico ou biocontrole de microrganismos é simplesmente o controle de um microrganismo através de outro microrganismo. Um conceito mais amplo seria a redução da soma do inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem (BETTIOL, 2009).

Um dos exemplos clássicos do uso de fungos antagonistas contra patógenos do solo é o experimento de Weindling e Fawcett (1936) citado por Lima et al. (2000) que trabalharam com o fungo *Trichoderma* sp. no controle de doenças em citros provocadas por *Rhizoctonia*

*solani*, obra esta que alavancou as pesquisas voltadas para o isolamento de fungos eficientes no controle de doenças de plantas.

Entre os principais fungos utilizados como agente de controle biológico se destacam *Trichoderma* spp., *Clonostachys* spp., *Verticillium* spp., *Gliocadium* spp., *Talaromyces* spp., *Pythium* spp., *Ampelomyces* spp. (DIAS, 2011; MELO, 1998; BETTIOL, 1991).

De acordo com Lima et al. (2000), o controle biológico é fundamentado nas interações antagonicas que ocorrem entre as espécies. Todavia os mecanismos envolvidos nesta interação ainda não foram totalmente compreendidos. As interações mais estudadas e melhor caracterizadas são aquelas que envolvem fungos fitopatogênicos e seus antagonistas (CHET, 1992; HARAN et al., 1996). Segundo estes e outros autores, o fungo agente de controle biológico interfere na vida do fitopatógeno por diversos mecanismos de ação como a competição por espaço e nutrientes, antibiose, micoparasitismo, predação, indução de resistência, entre outros:

- Competição: representada pela luta para aquisição de espaço físico, nutrientes, microelementos, água e luz. Parece evidentemente que esta estratégia engloba várias outras. Robbs (1992) indicou que a competição por alimentos e a antibiose, são os mecanismos mais frequentemente utilizados por agentes de biocontrole.
- Antibiose: quando o antagonista inibe a ação do fitopatógeno pela produção de substâncias e antibióticos voláteis ou não voláteis. Metabólitos com efeito fungicida difundido no meio de cultura são responsáveis pela inibição do crescimento do micélio, além de promover a desorganização de células e da lise de hifas de alguns fungos (AHMED et al., 2003).
- Micoparasitismo: envolve antibiose e canibalismo provocados pela ação de enzimas hidrolíticas como quitinases, glucanases, proteases e lipases, que provocam a morte de um deles, que assim, servem de alimento para o sobrevivente. Os hiperparasitas atacam hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência do fitopatógeno resultando com isso a redução da infecção e do inóculo deste último (BETTIOL, 1991). Espécies de *Trichoderma* têm sido consideradas na produção de enzimas quitinolíticas que possuem atividade deletéria em *Fusarium* spp. (MELO, 1996) e *Rhizoctonia solani* (HARMAN, 2000). Além disso, *Trichoderma* spp. podem prejudicar a viabilidade de escleródios de *Rhizoctonia solani* (MAFIA et al., 2003) e *Sclerotinia sclerotiorum* (MACHADO et al., 2001).
- Predação: quando determinado antagonista obtém seu alimento dos fitopatógenos e de outras fontes (BETTIOL, 1991).
- Hipovirulência: consiste na introdução de uma linhagem do patógeno menos agressiva ou avirulenta que pode transmitir estas características para o fitopatógeno (BETTIOL, 1991). De



acordo com Sneh (1999) é possível o biocontrole de determinados fitopatógenos com o emprego de cepas desses quando avirulentos ou hipovirulentos. A estratégia de ação do patógeno avirulento é competir pelo mesmo sítio infectivo do patógeno virulento e, dessa forma, proteger plantas contra doenças desse último.

- Indução de resistência: mecanismo de interação que consiste na ação de um indutor no metabolismo da planta hospedeira, alterando-a de tal maneira que esta adquire resistência a determinados patógenos (MORAES, 1991). Segundo Harman et al. (2004), a indução de resistência por *Trichoderma* spp. incrementa a expressão de genes relacionados com a defesa da planta e é similar ao processo de resistência adquirida.

Um agente de controle biológico pode atuar utilizando um ou mais mecanismos de interação antagônica, entretanto aquele que apresentar mais mecanismos tem maior chance de êxito no controle biológico de um patógeno (BETTIOL, 1991).

Com isso, o uso de agentes de controle biológico de doenças de plantas é uma importante área de pesquisa voltada para o combate a fitopatógenos, seja pela seleção de organismos antagonistas com elevado potencial de controle; usados diretamente sobre o patógeno; na indução de mutantes e na manipulação genética (PAPAVIZAS et al., 1982 citados por CASSIOLATO et al., 1996).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A.F.B. **Cultivo do Feijão da Primeira e Segunda Safra na Região Sul de Minas Gerais**. Embrapa Arroz e Feijão. Sistema de Produção 6. 2005.
- AHMED, A.S.; EZZIYYANI, C.; SÁNCHEZ, C.P.; CANDELA, M.E. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p.633-637. 2003.
- 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, 399 p. 2010.
- ALVIM, M.J.; BOTREL, M. de A.; XAVIER, D. F. As principais espécies de *Brachiaria* utilizadas no país. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. 4p. (Embrapa Gado de Leite. Comunicado Técnico, 22).  
**Biblioteca(s):** Epagri-Sede. 2002.
- ANISHA, C.; SACHIDANANDAN, P.; RADHAKRISHNAN, E.K. Endophytic *Paraconiothyrium* sp. from *Zingiber officinale* Rosc. Displays Broad-Spectrum Antimicrobial Activity by Production of Danthron. **Curr Microbiol**, v.75, p. 343-352. 2018.
- ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**. (Informa Economics FNP: São Paulo). 2008.
- 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.
- AVESKAMP, M.M.; GRUYTER, J.de.; WOUDEBERG, J.H.C.; VERKLEY, G.J.M.; CROUS, P.W. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterize *Phoma* and related pleosporales genera. **Studies in Mycology** 65: 1–60. 2010.
- AZEVEDO, J.L., ARAUJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N., DESHMUKH, S.K. (eds.) **Fungi multifaceted microbes** pp. 189–207 Anamaya, New Delhi. 2007.
- 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. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS, p.131-163. 2002.
- BALAJEE S.A.; SIGLER, L.; BRANDT, M.E. DNA and the classical way: Identification of medically important molds in the 21st century. **Medical Mycology** 45: 475–490. 2007.

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

BETTIOL, W. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Editado por Wagner Bettiol e Marcelo Augusto Boechat Morandi. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 341p. 2009.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura. p.1-3. 1991.

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.

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, v. 19, p. 341-349. 2005.

BUDZISZEWSKA, J.; SZYPULA, W.; WILK, M.; WRZOSEK, M. *Paraconiothyrium babiogorensis* sp. nov., a new endophyte from fir club moss *Huperzia selago* (L.) Bernh. ex Schrank and Mart. (Huperziaceae). **Mycotaxon** 115: 457–468. 2011.

CARVALHO, P.L.N.; AMARAL, P.O.; RUIZ, A.L.T.G.; DE ALENCAR, S.M.; PFENNING, L.H.; DE CARVALHO, J.E.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1: antioxidant and antiproliferative activities of endophytic fungus associated with *Rheedia brasiliensis* plant. **Int. J. Biotech. Well. Indus.** Volume 1, numero 3, p.172-176. 2012.

CASSIOLATO, A.M.R.; BAKER, R.; MELO, I.S. Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor* por mutantes de *Trichoderma harzianum* em segmentos de aipo. **Fitopatologia Brasileira**, n.21, p.120-122. 1996.

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

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

DAISY, B.; STROBEL, G.; EZRA, D.; CASTILLO, U.; BAIRD, G.; HESS, W.M. *Muscodora 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.

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** 20: 9–17. 2008.

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

DIAS, P.P. Controle biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* e sua contribuição no crescimento de plantas. **Tese** (Doutorado em Agronomia). p.100. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2011.

EMBRAPA GADO DE CORTE: *Panicum maximum* - híbrido BRS Tamani. Available in: <<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/2000/panicum-maximum---hibrido-brs-tamani>> Access in: 02/02/2018.

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.

FERNANDES, E.G.; PEREIRA, O.P.; SILVA, C.C.; CLAUDIA BRAGA PEREIRA BENTO, C.B.P.; QUEIROZ, M.V. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. **Microbiological Research**, v.181, p. 84-92. 2015.

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

GAMA, D.S. Fungos endofíticos em *Brachiaria* e *Cynodon*. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola). p.90. Universidade Federal de Lavras. 2014.

GORDON, R.A.; SUTTON, D.A.; THOMPSON, E.H.; SHRIKANTH, V.; VERKLEY, G.J.M. *Cutaneous phaeohyphomycosis* caused by *Paraconiothyrium cyclothyrioides*. **Journal of Clinical Microbiology** 50: 3795–3798. 2012.

GRUYTER, J.de.; 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** 75: 1–36. 2012.

GRUYTER, J.DE.; 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** 102: 1066–1081. 2010.

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.

HAN, M.; LIU, T.; CAI, X.; CHEN, K.; LIU, C.; BRIAN, K.; XUE, Y.; GU, Y. A new endophytic *Paraconiothyrium brasiliens* LT161 shows potential in producing antifungal metabolites against phytopathogens. **African Journal of Microbiology Research** Vol. 6(50), pp. 7572-7578. 2012.

HARAN, S.; SCHICKLER, R.; OPPENHEIM, A.; CHET, I. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. **Phytopathology**, v.86, p.980-985. 1996.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of bioncontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, New York, v.84, n°4, p.377-393. 2000.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A. CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Natural Review of Microbiology**, v.2, p.43-56. 2004.

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

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**, p. 226 - 228. 2010.

JANK, L.; BARRIOS, S.C.; DO VALLE, C.B.; SIMEÃO, R.M.;ALVES, G.F. The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science**, v. 65, n. 11, p. 1132-1137. 2014.

KHAN, A.L.; HAMAYUN, M.; HUSSAIN, J.; KANG, S.; LEE, I. The newly isolated endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. LK1 produces ascotoxin. **Molecules**, 17:1103-12. 2012.

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.** Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 10 p. 2000.

- 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, p.16 - 35. 1996.
- 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.
- LIMA, L.H.C.; De MARCO, J.L.; FELIX, C.R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.2, p.263-304. 2000.
- MACHADO, J.C. et al. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p.95-101, mar./abr. 2001.
- MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, L.A.; VENTURA, G.M.; SANFUENTES, E.A. Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.1, n.28, p.101-105. 2003.
- MAIA, N. da C. Fungal endophytes of *Panicum maximum* and *Pennisetum purpureum*: isolation, identification and antifungal potential. 49 p. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras. 2015.
- MELO, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle Biológico**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.1, p.17-67. 1998.
- MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocadium* como bioprotetores de plantas. In: Revisão Anual de Patologia de Plantas – RAPP. 1996. Passo Fundo, RS: **Copyright**, v.4, p.261-295. 1996.
- MOLINARI, O.G. Grasslands and grasses of Puerto Rico. Rio Piedras: University of Puerto Rico, 167p. (Bulletin, 102). 1952. In: **Produtividade do capim – Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia) em função da lâmina de irrigação e adubação nitrogenada**. 182p. Tese. (Doutorado em Agronomia – Irrigação e Drenagem) – Universidade São Paulo, Piracicaba-SP, 2002.
- MORAES, W.B.C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos, In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura, p.158-179. 1991.
- 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.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, 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.
- PAPAVIZAS, G.C.; LEWIS, J.A.; MOITY, A.E. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhance bioncontrol capabilities. **Phytopathology**, v.72, p.126-132. 1982.

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

PEROTTI, R. On the limits of biological enquiry in soil science. **Proc. Int. Soc. Soil Sci.** 2, 146–161. 1926.

QUAEDVLIEG, W.; VERKLEY, G.J.M.; SHIN, H-D.; BARRETO, R.W.; ALFENAS, A.C. Sizing up Septoria. **Studies in Mycology** 75: 307–390. 2013.

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

ROBB, F.C. Controle biológico de doenças em plantas. In: NETO, A.M.A; BARAN, C.L. (Ed.). **Manual de controle biológico**. Rio de Janeiro: Lidador, p.46-51. 1992.

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.; CHOHEYKLIN, 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.

SCHARDL, C.L.; FLOREA, S.; PAN, J.; NAGABHYRU,P.; SLADANA BEC, S.; CALIE, P.J. The *Epichloae*: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. **Current Opinion in Plant Biology**, 16:480–488. 2013.

SCHOCH, C.L.; CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; BOEHM, E.W.A.; BURGESS, T.I. A class-wide phylogenetic assessment of *Dothideomycetes*. **Studies in Mycology** 64: 1–15. 2009.

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

SKERMAN, P.J.; RIVEROS, F. Gramíneas Tropicales. Rome: FAO. 849p. (FAO Producción y Protección Vegetal, 23) 1992. In: **Produtividade do capim – Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia) em função da lâmina de irrigação e adubação nitrogenada**. 182p. Tese (Doutorado em Agronomia – Irrigação e Drenagem) – Universidade São Paulo, Piracicaba-SP, 2002.

SNEH, B. Uso de isolados não patogênicos de *Rhizoctonia* no controle biológico. **Summa Phytopathologica**, v.25, p.102-106. 1999.

SOLIMAN, S.S.M.; TROBACHER, C.P.; TSAO, R.; GREENWOOD, J.S.; RAIZADA, M.N. A fungal endophyte induces transcription of genes encoding a redundant fungicide pathway in its host plant. **BMC Plant Biology**, 13:93. 2013.

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

TAN, X.M.; CHEN, X.M.; WANG, C.L.; JIN, X.H.; CUI, J.L.; CHEN, J.; GUO, S.X.; ZHAO, L.F. Isolation and identification of endophytic fungi in roots of nine *Holcoglossum* plants (Orchidaceae) collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan provinces of China. **Current Microbiology**, 64(2): 140-7. 2012.

TIAN, Y; AMAND, S.; BUISSON, D.; KUNZ, C.; HACHETTE, F.; DUPONT, J.; NAY, B.; PRADO, S. The fungal leaf endophyte *Paraconiothyrium variabile* specifically metabolizes the host-plant metabolome for its own benefit. **Phytochemistry**, v.108, p.95-101. 2014.

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.

VERKLEY, G.J.M.; SILVA, M.da.; WICKLOW, D.T.; CROUS, P.W. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. **Studies in Mycology** 50: 323–335. 2004.

VERKLEY, G.J.M.; QUAEDVLIEG, W.; SHIN, H.D.; CROUS, P.W. A new approach to species delimitation in Septoria. **Studies in Mycology** 75: 213–305. 2013.

VERKLEY, G.J.M.; DUKIK, K.; RENFURM, R.; GÖKER, M.; STIELOW, J.B. Novel genera and species of *Coniothyrium*-like fungi in *Montagnulaceae* (Ascomycota). **Persoonia** 32, 2014: 25 – 51. 2014.

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

WEINDLING, R.; FAWCETT, W.S. Experiment in the control of *Rhizoctonia* damping-off of citrus seedling. **Hilgardia**, v.10, p.1-16. 1936.

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.

ZHANG, Y.; CROUS, P.W.; SCHOCH, C.L.; HYDE, K.D. *Pleosporales*. **Fungal Diversity** 53: 1–221. 2012.

**SEGUNDA PARTE****ARTIGO 1*****Paraconiothyrium: Identification and inhibition of Sclerotinia sclerotiorum***

Artigo redigido conforme as normas da revista científica Tropical Plant Pathology  
ISSN: 1983-2052 (versão preliminar)

## ABSTRACT

Endophytic fungi colonize living plant tissues, establishing mutually harmless relationships and are reported to inhibit the growth of phytopathogenic fungi. Fungi of the genus *Paraconiothyrium* are considered effective biological control agents and bioremediators. The aims of this study were to identify five fungi of the genus *Paraconiothyrium* using different molecular markers and morphology, to evaluate the inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum*, the parasitism and inactivity of its sclerotia. The fungi were reactivated in PDA at 25°C for 15 days. For sporulation, they were grown in five different culture media and temperatures. The molecular identification was based on the analyses of the ITS, LSU,  $\gamma$ -actin and  $\beta$ -tubulin regions. *In vitro* antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum* was measured and subsequently their sclerotia were immersed in the spore suspension of each endophytic fungus and distributed in triplicate Petri dishes on a germinating paper substrate, moistened with sterile distilled water. The viability test of these parasitized sclerotia was conducted on agar bromophenol medium (NEON). The fungi were identified as *P. cyclothyrioides* and *P. estuarinum*. All fungi presented inhibition against *S. sclerotiorum in vitro* and parasitized *S. sclerotiorum* sclerotia, four of which made these sclerotia unviable, thus presenting potential in the biological control of *S. sclerotiorum*.

*Keywords:* *Paraconiothyrium cyclothyrioides*, *Paraconiothyrium estuarinum*, biological control, molecular systematics, taxonomy.

## INTRODUCTION

Endophytic fungi colonize living tissues of various plants, establishing mutualistic relationship (Petrini, 1991; Azevedo et al., 2000; Hyde and Soyong, 2008). Their distribution within plants is ubiquitous but varies according to plant tissue (root, leaf, stems and fruits) and from strain to strain (Tan and Zou, 2001). Some metabolites produced by endophytic fungus can help the host plant tolerate biotic and abiotic stresses, protect plants against diseases and from insect and nematode attack, as well as favor the growth of crop plants (Kogel et al., 2006). In addition, endophytic fungi have been reported to reduce the growth of the different phytopathogenic fungi (Ezra and Strobel, 2003; Zhang et al., 2010; Suwannarach et al., 2012; Saxena et al., 2015).

The genus *Paraconiothyrium* (*Ascomycota* - *Dothideomycetes* - *Pleosporales* - *Montagnulaceae*) was proposed by Verkley et al. (2004) to accommodate some asexual morphs genetically distant from *Coniothyrium*, grouping them closer to *Paraphaeosphaeria*, and in this same work, four new species *Paraconiothyrium brasiliense*, *P. cyclothyrioides*, *P. estuarinum* and *P. fungicola* were described. Also, based on molecular phylogenetics, the fungus *Coniothyrium sporulosum* present in the soil and the important biological control agent *C. minitans*, were reclassified as *Paraconiothyrium* (Verkley et al., 2004), and later, reallocated to the genus *Paraphaeosphaeria* (Verkley et al., 2014). This genus is characterized by producing pycnidia relatively small, subhyaline, pigmented, one or two unicellular conidia, these species have also been described as endophytic, which inhabit the interior of plant tissues and organs without causing damage to their host, are often of great importance because they are considered to be effective biological control agents (acting through hyperparasitism) and bioremediators (Verkley et al., 2014). *Paraconiothyrium* currently has 23 species (Mycobank, 2018) and only one of them, *P. fuckelii*, has the known sexual phase (Gruyter et al., 2012).

The phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (*Ascomycota* - *Leotiomycetes* - *Helotiales* - *Sclerotiniaceae*) is a phytopathogen of world importance due to its occurrence in both temperate and subtropical or tropical regions, besides being a polyphagous fungus, covering 408 species of host plants (Bolton et al., 2006). The disease is one of the most destructive diseases of bean and soybean, important crops of Brazilian agribusiness, as well as other important crops such as potatoes, tomato, cotton, sunflower, canola and vegetables (Almeida and Seixas, 2010). In the Southeastern and Central-West regions of Brazil, the disease manifests itself with greater intensity in the autumn-winter season. At that time, low temperature, and moisture, provided by irrigation, favor the disease that is generally not harmful in traditional times of cultivation, in the cultivation of summer (from August to November) and in the cultivation of dry season (From January to March). The disease becomes even more harmful where there is abundant vegetative growth of the crop, little aeration and penetration of sunlight, poor soil drainage and inadequate crop rotation (Dalla Pria and Silva, 2010).

Biological control is the control of a microorganism through the use of another microorganism, the reduction of the sum of the inoculum or of the disease causing activities, caused by a pathogen, carried out by one or more organism other than man. It is now known that not only the microorganism can be used, but also products and/or compounds produced by them. Biological control agents, called antagonists, can act using one or more mechanisms of action, such as competition, antibiosis, induction of resistance, hyperparasitism and growth promotion (Bettiol, 2009).

The aims of this study were to identify species of the genus *Paraconiothyrium* using different molecular markers and morphology, to standardize a better culture medium and temperature for fungal growth and sporulation and evaluate the inhibition of *Sclerotinia*

*sclerotiorum*, the parasitism of the sclerotia and the viability of these sclerotia parasitized by these fungi of the genus *Paraconiothyrium*.

## MATERIAL AND METHODS

The experiments were carried out in the Laboratory of Bioprospection and Genetics of Filamentous Fungi (BIOGEN) of the Department of Biology/Sector of Agricultural Microbiology of the Federal University of Lavras - UFLA, Lavras, Minas Gerais, in partnership with the Department of Phytopathology of UFLA.

### Microorganisms evaluated and reactivation of fungi

The present study we used five species of the genus *Paraconiothyrium*, already isolated from *Panicum maximum* grasses and different *Brachiaria* species (Gama, 2014; Maia, 2015) (Table 1). Stock cultures were maintained in MilliQ autoclaved water by the Castellani method at 4°C (Castellani, 1967). For reactivation of these five fungi, these were inoculated in potato-dextrose-agar (PDA) at 25°C for 15 days. The fungi used in this work were deposited in the Mycological Collection of Lavras - CML (<http://www.dfp.ufla.br/cml/>).

### Molecular identification

Total DNA of the endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* was isolated according to protocol for DNA extraction from the UltraClean<sup>®</sup> Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc).

Amplification reactions were performed in a final volume of 30 µL, containing 15 µL Quiagen kit, 12 µL H<sub>2</sub>O, 10 pmol of each forward and reverse primer and 10 ng DNA on a MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler (Labnet International, Inc.). The molecular markers used in the amplification were internal transcribed spacer regions of the operon rDNA (ITS),

large subunit of rDNA (LSU),  $\gamma$ -actin and  $\beta$ -tubulin (Table 2). The sequences were deposited in NCBI "GenBank" for the provision of access numbers.

As described in the work of Costa et al. (2016), with modifications, the sequences were aligned using Clustal W (THOMPSON et al., 1994), and implemented in the software MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011) for Maximum parsimony analysis. Clade support was inferred from 1000 bootstrap replications. Phylogenetic reconstruction under criteria per partition was performed for the alignment with the combined dataset.

### **Culture medium and growth and sporulation temperatures**

The fungi were grown on PDA (potato infusion dextrose agar), OA (oat agar), MEA (malt extract agar), CMA (corn meal agar) and SDA (sabouraud agar) for 15, 30 and 45 days and incubated at different temperatures (15, 20, 25, 30 and 35°C) for evaluation of best culture medium and temperature for sporulation of these fungi (Table 3). The evaluations were done daily, every 24 h, during all the days of experiment, through the measurement of the colonies diameter, and preparation of slides in optical microscope for visualization of the structures.

### **Antagonistic activity of the endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum***

A fragment of the mycelium of *Paraconiothyrium* (approximately 8 mm) was placed on one side of Petri dishes containing PDA and incubated for 48 h at 25°C. After this time of incubation of *Paraconiothyrium*, fragments of approximately the same diameter were removed from the borders of the growing *S. sclerotiorum* and inoculated on the other side of the Petri dishes. The control consisted of a plaque with only the phytopathogen growing. Dishes with the two inoculated fungi were again incubated, however, at 20°C for 10 days, the temperature change from 25°C to 20°C was because the optimal growth temperature of *S.*

*sclerotiorum* ranges from 17-20°C. The tests were performed in triplicate. Those fungi that showed ability to inhibit phytopathogenic fungus growth were evaluated for inhibition by volatile compounds using the same methodology described above with subdivided Petri dishes, to evaluate whether inhibition of *S. sclerotiorum* growth was due to the action of volatile organic compounds “VOCs” (Strobel et al., 2001).

### **Parasitism of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia and viability of these sclerotia parasitized by endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium***

*Sclerotinia sclerotiorum* viable sclerotia, obtained from an infested soybean plantation, superficially disinfested (washed in running water - 70% alcohol for 1 minute - sodium hypochlorite for 2 minutes - washed in sterile distilled water three times), and were immersed, for 15 minutes, in spore suspension ( $10^7$  conidia mL<sup>-1</sup>), previously vortexed, from five *Paraconiothyrium* fungi. Five sclerotia were distributed in each Petri dish, in triplicate, on a substrate of germination paper moistened with sterile distilled water for induction of myceliogenic germination, and observation of parasitism by *Paraconiothyrium*. The dishes were incubated in BOD at 20°C with photoperiod for 12 h for 21 days. Evaluations of colonization or not of the sclerotia by the endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* were done daily during those 21 days. The control dish contained sclerotia not immersed in the mycelial suspensions of each fungus, but in autoclaved distilled water (adapted from Reis et al., 2011).

The test of viability of these parasitized sclerotia was conducted in agar bromophenol medium (NEON). The plates with sclerotia colonized by the endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* were placed in BOD at 20°C and photoperiod of 12 h for 10 days. The evaluations were done daily, with the purpose of detecting around the sclerotia, the formation or not of yellow-red halos, indicative of the presence of *Sclerotinia sclerotiorum* (Peres, 1996; Nasser et al., 1999; Napoleão et al., 2006).



## RESULTS

### Molecular identification

The five fungi used in this work were isolated in the works of Gama (2014) and Maia (2015) and already identified, using ITS, as belonging to the genus *Paraconiothyrium*. A new molecular identification was made using, in addition to ITS, the molecular markers: LSU,  $\gamma$ -actin and  $\beta$ -tubulin (Table 4 and Figure 1), and the isolates CML3695 and CML3699 were identified as belonging to the species *Paraconiothyrium estuarinum*, while the isolates CML3696, CML3697 and CML3698 were identified with *Paraconiothyrium cyclothyrioides*.

The performance of the four concatenated gene alignments (ITS, LSU, ACT and TUB) in the combined and separate phylogenetic inference is shown in Figure 1 and Figure 2. The measures agreed that TUB provided the most general support in combined and separate analysis, followed by ACT, ITS and LSU (data not shown). In the multi-locus phylogeny inferred from the combined dataset shown in Figure 1, several well supported clades can be identified, which are interpreted as appropriate for the delimitation of genera. The tree outgroup is formed by highly supported clades (1000 bootstrap replications) representing the genus *Paraphaeosphaeria*.

### Culture medium and growth and sporulation temperatures

The five fungi identified as belonging to the species *P. cyclothyrioides* and *P. estuarinum*, have very similar characteristics, both in morphology, in conidia production, structure and pigmentation of these, and thus, are considered sister species (Figure 3).

Through the preparation of fresh slides, for optical microscopy visualization, the best spore production ( $10^7$  conidia mL<sup>-1</sup>) was obtained on PDA and OA medium at 25°C, starting from 15 days of growth (Figure 4). The medium and temperature for growth of the fungi were the PDA medium and the temperature of 25°C.

### **Antagonistic activity against *Sclerotinia sclerotiorum*, parasitism of *S. sclerotiorum* sclerotia and viability of these parasitized sclerotia**

The five evaluated fungi inhibited *in vitro* *S. sclerotiorum* (Figure 5A, B and C). These five fungi were tested for the production of volatile organic compounds (VOCs), and none of them produced VOCs (Figure 5D).

All five fungi parasitized *in vitro* *S. sclerotiorum* sclerotia and four had a positive effect (fungicidal) on the viability of these sclerotia: *P. estuarinum* CML3699 and *P. cyclothyrioides*, isolates CML3696, CML3697 and CML3698. Besides parasitizing, they managed to kill these parasitized sclerotia (Figure 5E, F, G and H). The fungus *Paraconiothyrium estuarinum* CML3695 presented fungistatic effect, because it only parasitized the sclerotia in dish, and could not unfeasible these sclerotia in NEON medium.

## **DISCUSSION**

By analyzing the results of the trees, in isolation, we could conclude that the  $\beta$ -tubulin gene was able to separate the species, despite the low values of the branches. This pattern followed the order of genes, ACT, ITS and LSU. And only with the combination of the four genes in the construction of the combined tree. These results corroborate with those available in the literature in the identification of species of this genus (Verkley et al., 2014) reported that, since some species are morphologically very similar, and difficult to distinguish, molecular assessments are necessary for a better and more accurate identification at the genus *Paraconiothyrium* and *Coniothyrium*-like. This occurs in the present work, because the species are morphologically similar and considered sister species, the only difference being detected through molecular phylogenetics. The importance of using this study to identify fungal species, and when possible, the use of other genes that can clearly confirm the results obtained. It has already been observed that LSU can be used to determine the order and

especially also the family to which the fungus belongs. ITS alone can be sufficient for an accurate identification at the same level, since it was sufficiently variable among the most related taxa in *Montagnulaceae*, but did not distinguish at species level. More suitable for this purpose are, in principle, more variable genes such as ACT and TUB (Verkley et al., 2014).

Our results showed that the best culture media and temperature for growth and sporulation ( $10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) *Paraconiothyrium* fungi were the PDA and OA and the temperature of 25°C. These fungi presented a great and valuable characteristic, phenotypic plasticity, being able to grow both at 25°C, optimum growth temperature and spore production, and at 20°C, temperature that parasitized *S. sclerotiorum* sclerotia. It is known that *S. sclerotiorum* has an optimal growth temperature between 17-20°C, and that the apex of disease manifestation caused by this pathogen, occurs in colder periods, with lower temperatures (Dalla Pria e Silva, 2010). And, since the antagonist can grow and act, even at lower temperatures, this would aid in the control of the phytopathogen, which is an advantage for the potential agent of biological control. The results of parasitism of *S. sclerotiorum* sclerotia by *Paraconiothyrium* fungi and unviable parasitic sclerotia indicate that the inhibition of *S. sclerotiorum* by these five fungi occurs by another mechanism of action (some compound synthesized directly in the culture medium - antibiosis, and/or hyperparasitism). Hyperparasitism is commonly reported in the species *Paraconiothyrium minitans*, currently *Paraphaeosphaeria minitans*, isolated soil fungi, and considered an important biological control agent, because it has the ability to parasitize sclerotia (Verkley et al., 2014). Smolinska et al. (2016) evaluated the possibility of eradication of *S. sclerotiorum* sclerotia from the soil using *Trichoderma* isolates multiplied in organic transporters prepared from agroindustrial residues and bioproducts, and they could observe that the alteration of the soil with organic materials covered with *Trichoderma* fungi had a significant reducing effect on *S. sclerotiorum*, and especially effective was the WsA (wheat straw + apple pomaceae)

transporter covered with *T. virens* TRS114, which completely prevented the survival of *S. sclerotiorum* sclerotia regardless of the application dose. This is an example of a study that we can follow in the future, but using the endophytic fungi *Paraconiothyrium cyclothyrioides* and *P. estuarinum*, which had positive results in the parasitism and the viability of the sclerotia and that have not yet been reported in the ability to parasitize and unviabilize *S. sclerotiorum* sclerotia, and also, using OA culture medium, which is a cheap, simple medium that was positive in growth and sporulation of *Paraconiothyrium* fungi.

It was possible, from molecular phylogenetics, to identify the five fungi evaluated as *Paraconiothyrium cyclothyrioides* and *Paraconiothyrium estuarinum*. The best culture medium and temperature for fungal growth and sporulation were the PDA Medium and the temperature of 25°C. These fungi presented potential inhibition against *in vitro* *Sclerotinia sclerotiorum*. All five fungi parasitized *S. sclerotiorum* sclerotia. Four of these fungi, besides parasitizing *S. sclerotiorum* sclerotia, were able to inactivate these sclerotia (fungicidal effect), thus showing the potential of these endophytic fungi in the biological control of *S. sclerotiorum*. This is the first report of fungi of the species *Paraconiothyrium cyclothyrioides* and *P. estuarinum*, isolated from tropical grasses, such as hyperparasites of *S. sclerotiorum*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support and scholarships. This work has no conflict of interest.

## REFERENCES

Almeida AMR, Seixas CDS (Eds.) (2010) Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura. 1ª. Ed. Londrina, PR. Embrapa Soja.

Aveskamp MM, Verkley, GJM, de Gruyter, J, Murace MA, Perelló A, Woudenberg, JHC, Groenewald, JZ, Crous, PW (2009) DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia* 101:363-382.

Azevedo JL, Maccheroni Junior W, Pereira JO, Araújo WL (2000) Endophytic microorganisms: a review of insect control and recent advances on tropical plants. *EJB: Electronic Journal of Biotechnology* 3:15-16.

Bettiol W, Morandi, MAB (Eds.) (2009) Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. 1ª. Ed. Jaguariúna, SP. Embrapa Meio Ambiente.

Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD (2006) *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7:1-16.

Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.

Castellani A (1967) Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further Researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70:181-184.

Costa SS, Matos KS, Tessmann DJ, Seixas CDS, Pfenning LH (2016) *Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. *Fungal Biology* 120:51-60.

Dalla Pria M, Silva OC (Eds.) (2010) Cultura do feijão: doenças e controle. 1ª. Ed. Ponta Grossa. UEPG.

Ezra D, Strobel GA (2003) Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. Plant Science 165:1229-1238.

Gama DS (2014) Fungos endofíticos em *Brachiaria* e *Cynodon*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, Brasil.

Gruyter J de, Woudenberg JHC, Aveskamp MM, Verkley GJM, Groenewald JZ, Crous PW (2012) Redisposition of *Phoma*-like anamorphs in *Pleosporales*. Studies in Mycology 75:1-36.

Hyde KD, Soyong K (2008) The fungal endophyte dilemma. Fungal Diversity 33:163-173.

Kogel KH, Franken P, Hüchelhoven R (2006) Endophyte or parasite—what decides? Current opinion in plant biology 9:358-363.

Maia, NC (2015) Fungal endophytes of *Panicum maximum* and *Pennisetum purpureum*: isolation, identification and antifungal potential. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, Brasil.

Markovskaja S, Kacergius A (2014) Morphological and molecular characterisation of *Periconia pseudobyssoides* sp. nov. and closely related *P. byssoides*. Mycological Progress 13:291-302.

Mycobank. *Paraconiothyrium*. Available at:

<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=117319&Fields=All>.

Accessed on January 08, 2018.

Napoleão R, Nasser L, Lopes C, Café Filho A (2006) Neon-S, novo meio para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. *Summa Phytopathologica* 32:180-182.

Nasser LCB, Arancibia RC, Napoleão R (1999) Uso do meio Neon modificado para determinação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão produzidas em áreas irrigadas do cerrado. *Fitopatologia Brasileira* 24:309.

Peres AP (1996) Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* L. Merrill): desenvolvimento de metodologias. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade), Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, Brasil.

Petrini O (1991) Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews JH, Hirano SS (Eds.) *Microbial ecology of leaves*. New York, NY, USA. Springer. pp. 179-197.

Rajendran C, Baby A, Kumari S, Verghese T (1991) An evaluation of straw-extract agar media for the growth and sporulation of *Madurella mycetomatis*. *Mycopathologia* 115:9-12.

Reis EM, Casa RT, Gava F, Moreira ÉN, Sachs C (2014) Indução da germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes substratos. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 10:145-150.

Rodríguez K, Stchigel A, Guarro J (2002) Three new species of *Chaetomium* from soil. *Mycologia* 94:116–126.

Saxena S, Meshram V, Kapoor N (2015) *Muscodor tigerii* sp. nov.-Volatile antibiotic producing endophytic fungus from the Northeastern Himalayas. *Annals of Microbiology* 65:47-57.

- Smolinska U, Kowalska B, Kowalczyk W, Szczech M, Murgrabia A (2016) Eradication of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia from soil using organic waste materials as *Trichoderma* fungi carriers. *Journal of Horticultural Research* 24:101-110.
- Strobel GA, Dirkse E, Sears J, Markworth C (2001) Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 147:2943-2950.
- Suwannarach N, Kumla J, Bussaban B, Lumyong S (2012) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* AG-2, the causal agent of damping-off by *Muscodor cinnamomi* CMU-Cib 461. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:3171-3177.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.
- Tan RX, Zou WX (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports* 18:448-459.
- Thompson RS, Aveling TAS, Prieto RB (2013) A new semi-selective medium for *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* and *F. verticillioides* in maize seed. *South African Journal of Botany* 84:94-101.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Verkley GJM, Dukik K, Renfurm R, Göker M, Stielow JB (2014) Novel genera and species of *Coniothyrium*-like fungi in *Montagnulaceae* (Ascomycota). *Persoonia* 32: 25–51.



Verkley GJM, Silva M da, Wicklow DT, Crous PW (2004) *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. *Studies in Mycology* 50:323–335.

Vilgalys R, Hester M (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172:4238-4246.

Wang XW, Wang XL, Liu FJ, Zhao XM, Li J, Cai L (2014) Phylogenetic assessment of *Chaetomium indicum* and allied species, with the introduction of three new species and epitypification of *C. funicola* and *C. indicum*. *Mycological Progress* 13:719-732.

White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White, TJ (Eds.) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York, NY, USA. Academic Press. pp. 315-322.

Zhang CL, Wang GP, Mao LJ, Monika KZ, Yuan ZL, Lin FC, Druzhinina IS, Kubicek CP (2010) *Muscodor fengyangensis* sp. nov. from southeast China: morphology, physiology and production of volatile compounds. *Fungal biology* 114:797-808.

Table 1 - Identification of the endophytes of the genus *Paraconiothyrium* by location, environment and host from which they were isolated.

Location/Environment	Host <sup>1</sup>	Identification
Embrapa Gado de Corte Campo Grande-MS, Brazil/Pasture field	<i>Brachiaria humidicola</i> common	<i>P. estuarinum</i> (CML3699)
Embrapa Gado de Corte Campo Grande-MS, Brazil/Pasture field	<i>Brachiaria humidicola</i> cv. Lanero	<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3698)
Embrapa Gado de Leite Juiz de Fora-MG, Brazil/Experimental plots	<i>Brachiaria ruziziensis</i>	<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3697)
Embrapa Gado de Leite Juiz de Fora-MG, Brazil/Experimental plots	<i>Panicum maximum</i>	<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3696)
Embrapa Gado de Leite Juiz de Fora-MG, Brazil/Experimental plots	<i>Panicum maximum</i>	<i>P. estuarinum</i> (CML3695)

<sup>1</sup>Isolation from stem.

Table 2 - Sequences of the gene region for amplification and conditions of the Polymerase Chain Reaction (PCR).

Locus	Primer Name	Primer Sequence 5'-3'	Direction	Condition for the PCR reaction	Reference
γ-actin	ACT-512f	ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC	Forward	Initial denaturation 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 1min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min and final extension of 72°C for 6 min.	AVESKAMP et al. (2009)
	ACT783r	TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT	Reverse		
β-tubulin	TUB4Fd	GTB CAC CTY CAR ACC GGY CAR TG	Forward	Initial denaturation 95°C for 5 min, 40 cycles of 95°C for 30s, 52°C for 30 s, 72°C for 80s and final extension of 72°C for 7 min.	CARBONE; KHON (1999)
	TUB4Rd	CRG AYT GRC CRA ARA CRA AGT TGT C	Reverse		
Large Subunit of rDNA (LSU)	LR0R	ACC CGC TGA ACT TAA GG	Forward	Initial denaturation 95°C for 2 min, 35 cycles of 95°C for 1 min, 49°C for 30 s, 72°C for 1 min and final extension of 72°C for 7 min.	VERKLEY et al. (2014)
	LR5	TCC TGA GGG AAA CTT CG	Reverse		
Internal Transcribed Spacer (ITS) – 5.8S of rDNA	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Forward	Initial denaturation 95°C for 2 min, 35 cycles of 95°C for 1 min, 50°C for 1 min, 72°C for 1 min and final extension of 72°C for 7 min.	WHITE et al. (1990)
	ITS4	TCC TCC GCT TTA TTG ATA TGC	Reverse		

Table 3 - Culture media used for sporulation and growth of endophytic fungi.

Medium	Composition	Reference
Incubation at 15, 20, 25, 30 and 35°C		
Malt Extract Agar (MEA)	20 g L <sup>-1</sup> malt extract; 20 g L <sup>-1</sup> glucose; 1 g L <sup>-1</sup> peptone; 20 g L <sup>-1</sup> agar.	Markovskaja and Kacergius (2014)
Oatmeal Agar (OA)	30 g L <sup>-1</sup> oatmeal; 15 g L <sup>-1</sup> agar	Rodríguez; Stchigel; Guarro (2002)
Corn Meal Agar (CMA)	60 g L <sup>-1</sup> corn meal; 15 g L <sup>-1</sup> agar	Thompson; Aveling; Prieto (2013)
Sabouraud Agar (SDA)	40 g L <sup>-1</sup> glucose; 10 g L <sup>-1</sup> peptone; 15 g L <sup>-1</sup> agar	Rajendran et al. (1990)
Potato Dextrose Agar (PDA)	Potato infusion from 200 g L <sup>-1</sup> ; 20 g L <sup>-1</sup> dextrose; 15 g L <sup>-1</sup> agar	Wang et al. (2014)

Table 4 - Identification of *Paraconiothyrium* using ITS, LSU,  $\gamma$ -actin and  $\beta$ -tubulin.

Isolate	Species	GenBank accession number			
		ITS	LSU	ACT	TUB
CML3695	<i>P. estuarinum</i>	MF374467	MF374462	MF374477	MF374472
CML3699	<i>P. estuarinum</i>	MF374471	MF374466	MF374481	MF374476
CML3696	<i>P. cyclothyrioides</i>	MF374468	MF374463	MF374478	MF374473
CML3697	<i>P. cyclothyrioides</i>	MF374469	MF374464	MF374479	MF374474
CML3698	<i>P. cyclothyrioides</i>	MF374470	MF374465	MF374480	MF374475

Figure 1 - Maximum parsimony tree of the *Paraconiothyrium* spp. inferred from four concatenated gene alignments (ITS, LSU, ACT and TUB) yielding a total of 1993 characters. Bootstrap values  $\geq 70\%$  is above the nodes.

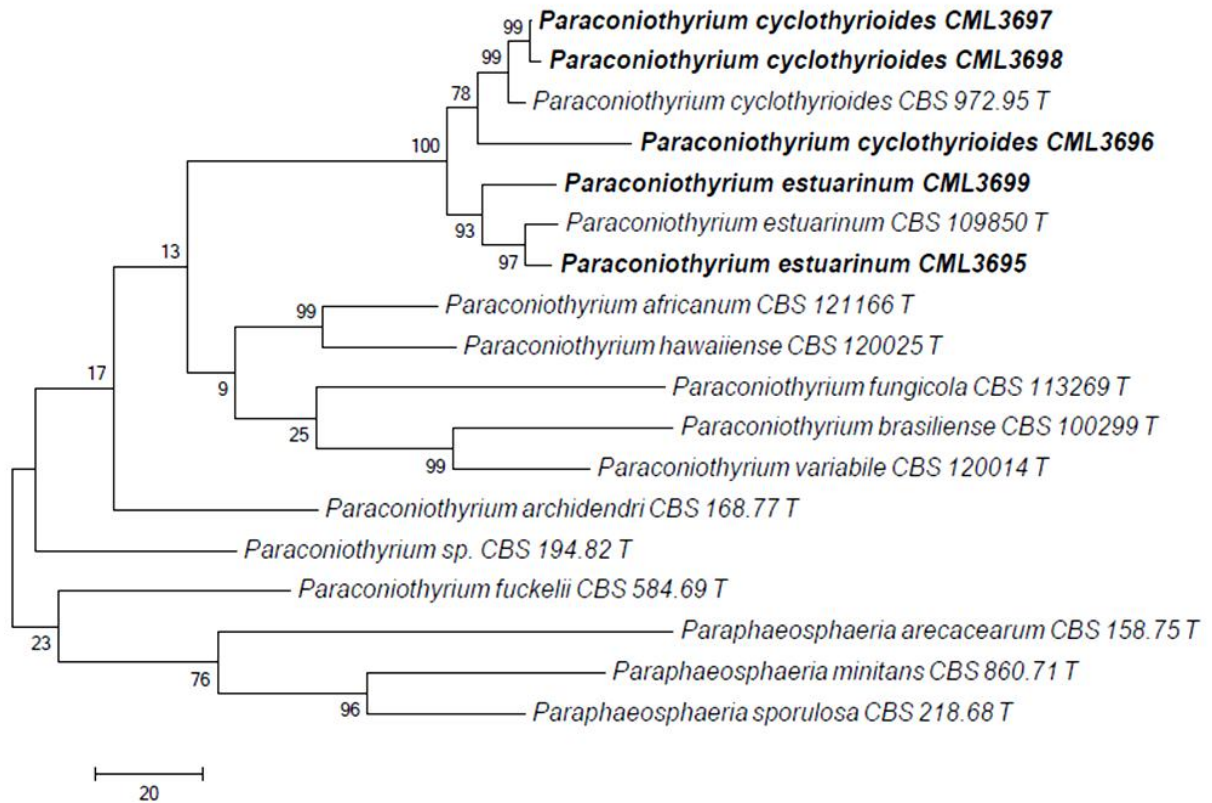


Figure 2 - Maximum parsimony tree of the *Paraconiothyrium* spp. inferred from gene alignments TUB. Bootstrap values  $\geq 70\%$  is above the nodes.

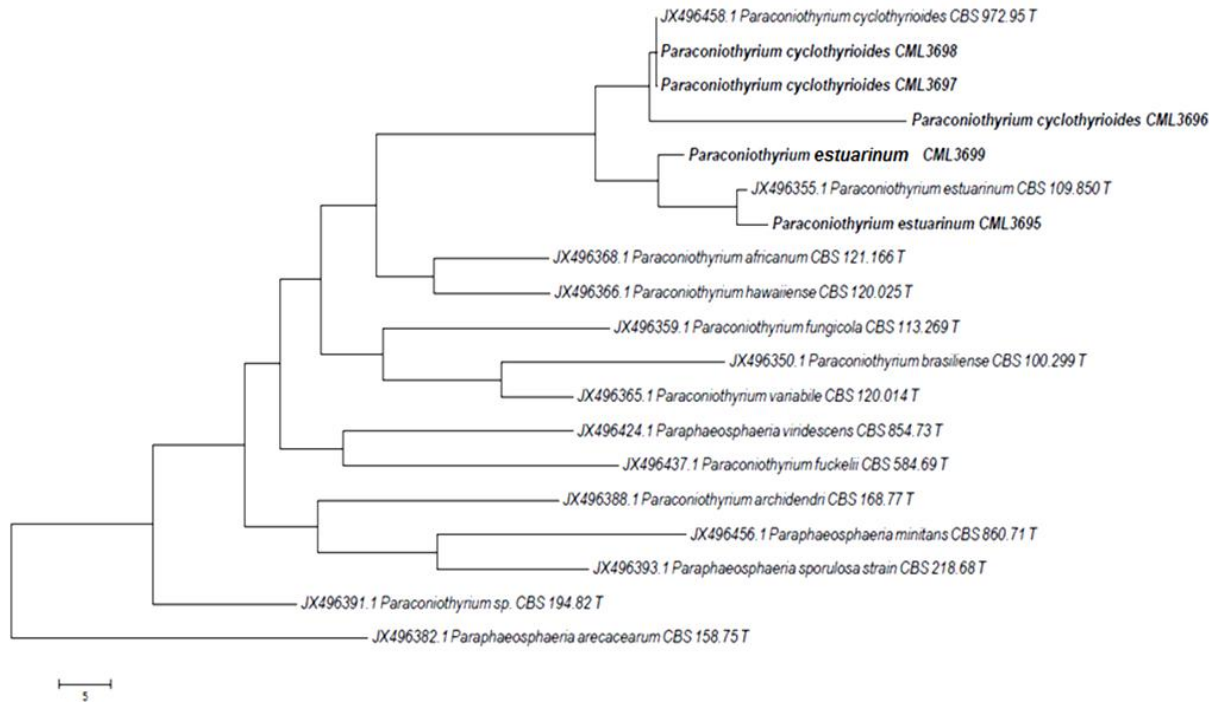


Figure 3 - (A, B, C, D and E) Morphology of the five endophytic fungi (CML3695, CML3696, CML3697, CML3698 and CML3699 respectively) of the genus *Paraconiothyrium* grown in PDA, 25°C for 15 days; (F) Conidia of *Paraconiothyrium cyclothyrioides*; (G) Conidia of *Paraconiothyrium estuarinum* observed in Light Optical Microscope in the 40x objective using blue cotton dye for the preparation of fungi blades.

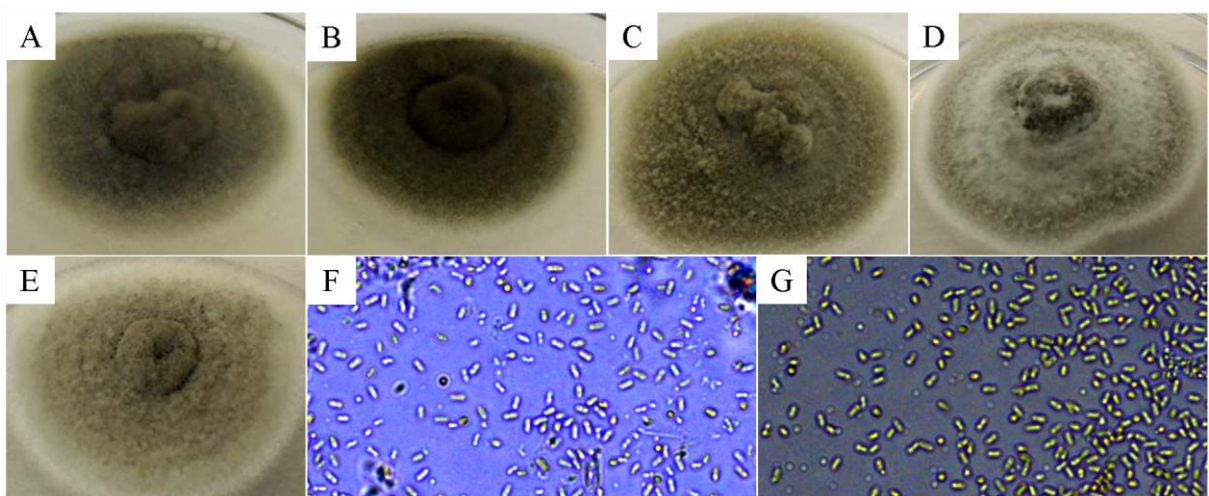




Figure 4 - Morphology of the five species of *Paraconiothyrium* grown in OA and PDA medium, after 20 days of incubation at 25°C. Better mediums and temperature for spore production.

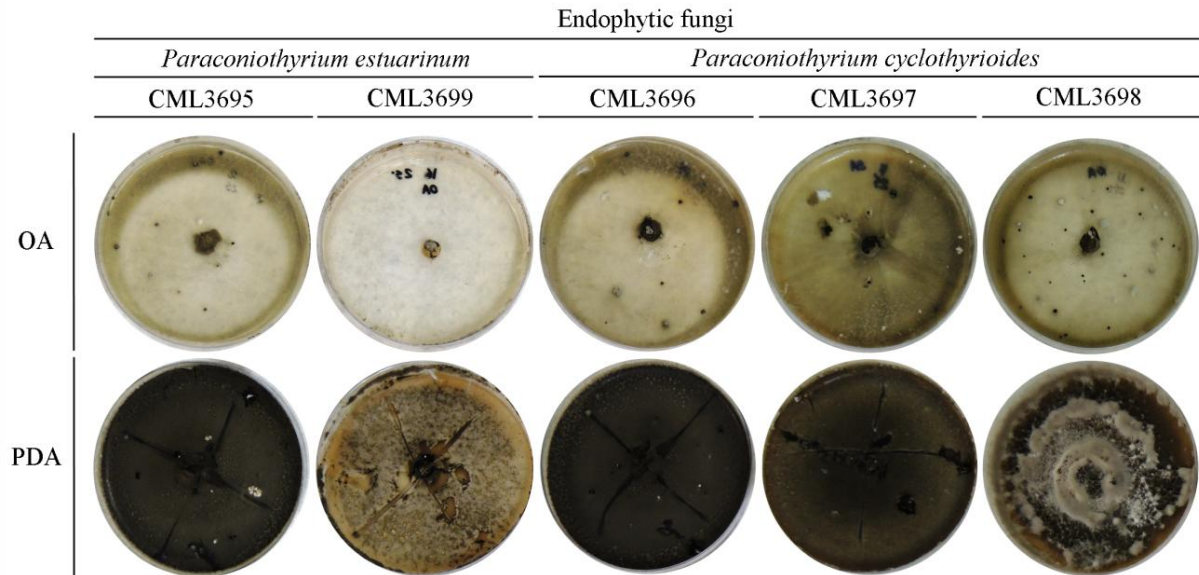
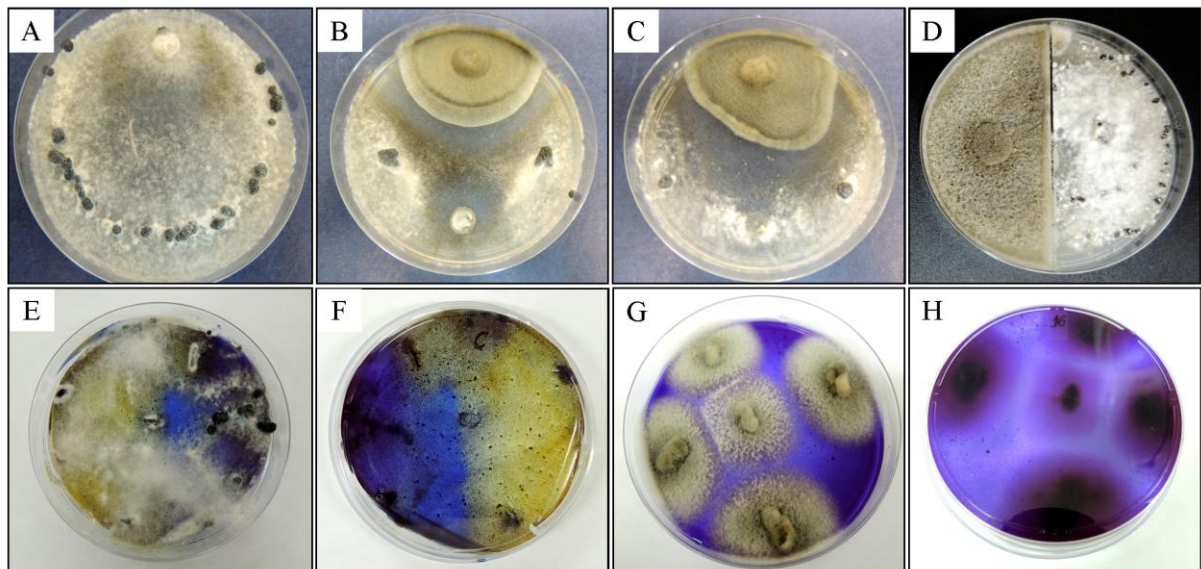


Figure 5 - (A) Control (sclerotia of germinated *S. sclerotiorum*); (B and C) Antagonism of fungi of the genus *Paraconiothyrium* against the pathogen *S. sclerotiorum*; (D) Evaluation of production of volatile compounds by fungi that were able to inhibit *in vitro* *S. sclerotiorum*; to the left of the plaque, the endophytic; to the right, the phytopathogen; (E and F) Viability of *S. sclerotiorum* sclerotia parasitized by endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium*, front and back, respectively; (G and H) Isolate CML3699 parasitizing and making unfeasible sclerotia (non-yellowish halo formation).



**ARTIGO 2****Endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* on the germination and performance of tropical grasses**

Artigo redigido conforme Manual de normalização e estrutura de trabalhos acadêmicos:  
TCCs, monografias, dissertações e teses da UFLA (versão preliminar)

## ABSTRACT

Endophytic fungi colonize living plant tissues, establishing mutually harmless relationships and are reported to inhibit the growth of phytopathogenic fungi. Fungi of the genus *Paraconiothyrium* are considered effective biological control agents and bioremediators. The aims of this study were to optimize a technique of inoculation of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *Panicum maximum* cv. BRS Tamani seeds using endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium*, to evaluate the germination and the development of the plants from these seeds and the development of the plants from these seeds under normal conditions and under water stress. The fungi were reactivated in PDA at 25°C for 15 days. To evaluate the influence of the osmotic potential on the mycelial growth of the fungus, different concentrations of mannitol were tested (-0.6; -0.8; -1.0 and -1.2 MPa). The highest osmotic potential (-1.2MPa) was used because there was no significant difference between the different potentials tested. There was an increase in the number of germinated seeds, in relation to the control, inoculated with the fungi CML3697, CML3698 and CML3699 for *Brachiaria* and with the fungi CML3697 and CML3699 for *Panicum*. For *Brachiaria*, there was a gain of plant mass in the seeds inoculated with the fungi CML3695, CML3696 and CML3698, and for *Panicum*, in the seeds inoculated with the fungi CML3695, CML3698 and CML3699. Under water stress, an increase in the percentage of germination was observed for both forage grasses, in relation to the experiment without water stress. Endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* can stimulate the germination of forage seeds and the development of the plants from these inoculated seeds.

*Keywords:* *Brachiaria brizantha*, *Panicum maximum*, hydric stress, osmotic potential, seed germination.

## INTRODUCTION

Endophytic fungi colonize living tissues of various plants, establishing mutualistic relationship (PETRINI, 1991; AZEVEDO et al., 2002; HYDE; SOYTONG, 2008). Their distribution within plants is ubiquitous but varies according to plant tissue (root, leaf, stems and fruits) and from strain to strain (TAN; ZOU, 2001). Some metabolites produced by endophytic fungus can help the host plant to tolerate biotic and abiotic stresses, protect plants against diseases and from insect and nematode attack, as well as favor the growth of crop plants (KOGEL et al., 2006). In addition, endophytic fungi have been reported to reduce the growth of the different phytopathogenic fungi (EZRA; STROBEL, 2003; ZHANG et al., 2012; SUWANNARACH et al., 2012; SAXENA et al., 2015).

The genus *Paraconiothyrium* (*Ascomycota* - *Dothideomycetes* - *Pleosporales* - *Montagnulaceae*) was proposed by Verkley et al. (2004) to accommodate some asexual morphs genetically distant from *Coniothyrium*, grouping them closer to *Paraphaeosphaeria*, and in this same work, four new species *Paraconiothyrium brasiliense*, *P. cyclothyrioides*, *P. estuarinum* and *P. fungicola* were described. Also, based on molecular phylogenetics, the fungus *Coniothyrium sporulosum* present in the soil and the important biological control agent *C. minitans*, were reclassified as *Paraconiothyrium* (VERKLEY et al., 2004), and later, reallocated to the genus *Paraphaeosphaeria* (VERKLEY et al., 2014). This genus is characterized by producing pycnidia relatively small, subhyaline, pigmented, one or two unicellular conidia, these species have also been described as endophytic, which inhabit the interior of plant tissues and organs without causing damage to their host, are often of great importance because they are considered to be effective biological control agents (acting through hyperparasitism) and bioremediators (VERKLEY et al., 2014). *Paraconiothyrium* currently has 23 species (MYCOBANK, 2018) and only one of them, *P. fuckelii*, has the known sexual phase (GRUYTER et al., 2012).

The genus *Brachiaria* is composed by approximately 100 species, distributed in tropical and subtropical regions, mainly in the African continent. Four of these species, *Brachiaria decumbens*, *B. brizantha*, *B. humidicola* and *B. ruziziensis* are used as forage plants in tropical America, mainly in Brazil (KELLER-GREEN et al., 1996). The success of

forage cultivation of this genus is mainly due to resistance to pasture spittlebug, its adaptability to various production systems and types of soils, of low and medium fertility, flooded, forest margins and even semi-desertic regions (VALLE et al., 2009). They possess C4 metabolism that confers high photosynthetic efficiency at high temperatures and high irradiances, due to the lower carbon loss through photorespiration. It has a high potential for forage production and adaptation to tropical regions (RODRIGUES; SANTOS, 2002). Brazil has approximately 190 million hectares of pasture, and the *Brachiaria* genus occupies about 85% of that area (ANUALPEC, et al., 2008).

The species *Panicum maximum* Jacq. is native to tropical Africa and has great importance in the Brazilian scenario, being well adapted to deep soils, well drained and medium to high fertility. For this reason, a great part of the studies involving forage cultivars is being directed to this species (VALLE et al., 2009). This species is described as a perennial, shrub-forming culture with a deep root system, with a height varying from 60 to 200 cm, dark green leaf limbs with a width of 35 mm, which are reduced to end with thin tips and panicles with 12 to 40 cm in height (SKERMAN; RIVEROS, 1992). The depth of its root system varies, under favorable conditions, from 45 to 150 cm deep (MOLINARI, 1952). The cultivar BRS Tamani is the first hybrid of *P. maximum* from Embrapa, a result of a cross at the Embrapa Gado de Corte in 1992. It has low characteristics, with high production of leaves of high nutritive value (high levels of crude protein and digestibility), productivity and vigor, being easy to handle and resistant to grasshoppers. It is not indicated for areas subject to flooding even if temporary because it presents low tolerance to soil flooding. In conditions of low temperatures, it presents greater persistence (EMBRAPA Gado de Corte, 2018).

The aims of this study were to optimize a technique of inoculation of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *Panicum maximum* cv. BRS Tamani seeds using endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium*, to evaluate the germination of the inoculated seeds and the development/performance of the plants from these seeds.

## **MATERIAL AND METHODS**

The experiments were carried out in the Laboratory of Bioprospection and Genetics of Filamentous Fungi - BIOGEN of the Department of Biology/Sector of Agricultural Microbiology of the Federal University of Lavras - UFLA, Lavras, Minas Gerais, in partnership with the Department of Phytopathology of UFLA.

### Microorganisms evaluated and reactivation of fungi

For the present study, five fungi of the genus *Paraconiothyrium* were used, two of the species *Paraconiothyrium estuarinum* (CML3695 and CML3699) and three of the species *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (CML3696, CML3687 and CML3698) already isolated from *Panicum maximum* grasses and different *Brachiaria* species (Gama, 2014; Maia, 2015) (Table 1). Stock cultures were maintained in MilliQ autoclaved water by the Castellani method at 4°C (CASTELLANI, 1967). For the reactivation of these five fungi, these were inoculated in potato-dextrose-agar (PDA) at 25°C for 15 days. The fungi used in this work are deposited in the Mycological Collection of Lavras - CML (<http://www.dfp.ufla.br/cml/>).

Table 1 - Identification of the endophytes of the genus *Paraconiothyrium* by location, environment and host from which were isolated.

Location/Environment	Host <sup>1</sup>	Identification
Embrapa Gado de Corte Campo Grande-MS, Brazil/Pasture field	<i>Brachiaria humidicola</i> common	<i>P. estuarinum</i> (CML3699)
Embrapa Gado de Corte Campo Grande-MS, Brazil/Pasture field	<i>Brachiaria humidicola</i> cv. Lanero	<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3698)
Embrapa Gado de Leite Juiz de Fora-MG, Brazil/Experimental plots	<i>Brachiaria ruziziensis</i>	<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3697)
Embrapa Gado de Leite Juiz de Fora-MG, Brazil/Experimental plots	<i>Panicum maximum</i>	<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3696)
Embrapa Gado de Leite Juiz de Fora-MG, Brazil/Experimental plots	<i>Panicum maximum</i>	<i>P. estuarinum</i> (CML3695)

<sup>1</sup>Isolation from stem.

### Effect of water restriction (PDA medium modified with Mannitol) on the mycelial growth of the endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* for inoculation of forage seeds

The five endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* were grown in modified PDA medium with four different concentrations of Mannitol (-0.6; -0.8; -1.0 and -1.2 MPa) to evaluate if this difference in the osmotic potential of the medium would interfere with the mycelial growth of these fungi. For the control, PDA medium was used (without

modification) because it already has an osmotic potential of -0.35 MPa. The calculation of the different osmotic potentials was done using the formula proposed by Van't Hoff (VOET et al., 2001):

$$\Psi_{os} = -iRTC$$

where,  $\Psi_{os}$  = Osmotic potential (MPa);  $i$  = Isotonic coefficient (Mannitol =  $1\text{molL}^{-1}$ );  $R$  = General perfect gas constant;  $T$  = absolute temperature ( $^{\circ}\text{K}$ );  $C$  =  $\text{molL}^{-1}$  concentration.

The evaluation of the mycelial growth rate of fungi was done using the formula proposed by Oliveira (1991), calculating mycelial growth rate index:

$$\text{MGRI} = \frac{\sum (D-Da)}{N}$$

where the sum of the quotients between the colony diameter and the number of days elapsed until the evaluation is evaluated.

The experiment was conducted in a completely randomized design (DIC) composed of six treatments with five osmotic potentials and four replicates, totaling 120 experimental units, and the dishes were incubated at  $25^{\circ}\text{C}$  for 15 days. The results were submitted to analysis of variance by the SISVAR program (FERREIRA, 2000) and the means were compared by the Tukey test at the significance level of 5%.

**Evaluation of the germination of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *Panicum maximum* cv. BRS Tamani and development of plants from these seeds inoculated with endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium***

Seeds of *B. brizantha* cv. Marandu and *P. maximum* cv. BRS Tamani were washed in running water, and then disinfested in 70% alcohol for 2 minutes, sodium hypochlorite 2.0% for 2 minutes and distilled water autoclaved for 3 times. They were then dried in a laminar flow chamber on filter paper for 15 minutes (adapted from KELEMU et al., 1996). The seeds were inoculated by the physiological conditioning technique developed by Machado et al. (2012). For inoculation, Petri dishes were used, in which Mannitol -1.2% modified PDA medium was poured. Mycelial discs of the five fungi, approximately 8mm in diameter, our placed culture medium, and the dishes were maintained in BOD at  $25^{\circ}\text{C}$  for 15 days.



After mycelial growth of the fungi, 120 seeds/dish of each forage grass were distributed in a single layer on the colony of each fungus, being careful to keep the surface of the seed in contact with the surface of the fungi, totaling 720 seeds of each grass, because the experiment was performed out with four replications for each treatment (six treatments = five fungi + control treatment). Again, these plates were incubated in BOD under the same conditions, for 72 hours, as it is the maximum time that the seeds stay in contact with the fungi until they begin to emit radicle. The control was prepared with seeds not inoculated with fungal mycelium.

After the treatment of the seeds, they were transferred to 5L pots containing soil and sand in the proportion of 2:1, in a greenhouse, for 90 days, being 30 seeds per pot, and four treatments for each forage grass, to evaluate the germination (number of seeds germinated in the first 30 days of evaluation) and its development/performance of plants, taking into account factors such as height (centimeter) of aerial part and root, dry weight and green weight (grams) of aerial part and root. The height and green weight of the plants (aerial part and root) were measured shortly after harvesting, each part of the plant (aerial part and root) was placed in sacks separately and taken to be dried in an oven at 60°C (up to constant dry weight).

The same experiment was repeated, however, evaluating one more variable, water stress. During the initial 30 days of the experiment (seed germination period) the treatments were watered every 6 days. The control treatment was watered every day.

The statistical design adopted was completely randomized (DIC), with 4 replicates for each treatment and the data were transformed into  $\sqrt{X + 1}$ . The results of the seed germination percentage and the evaluation of the performance of the plants from these seeds (aerial length and root length, green and dry weight of aerial part and root) were submitted to analysis of variance by the SISVAR program (FERREIRA, 2000) and means were compared by the Scott-Knott test at ( $p < 0.05$ ) level of significance.

## **RESULTS**

**Effect of water restriction (PDA medium modified with Mannitol) on the mycelial growth of the endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* for inoculation of forage seeds**

No significant interaction was observed for mycelial growth rate index (MGRI) in all osmotic potentials evaluated. The isolated interaction and potential osmotic was not significant, demonstrating that there is no difference between isolates against these different osmotic potentials. The five fungi presented similar behavior (Table 2). We conclude that the value of the greater osmotic potential can be used to delay the germination time of the seeds, in the fungus - seeds interaction, without harm the growth of fungi, not affecting the viability of these seeds that germinated after 72 h incubated at 25°C and inoculated with the endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium*.

Table 2 - Different concentrations of Mannitol on the mycelial growth (IVCM) of the endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* for inoculation of forage seeds.

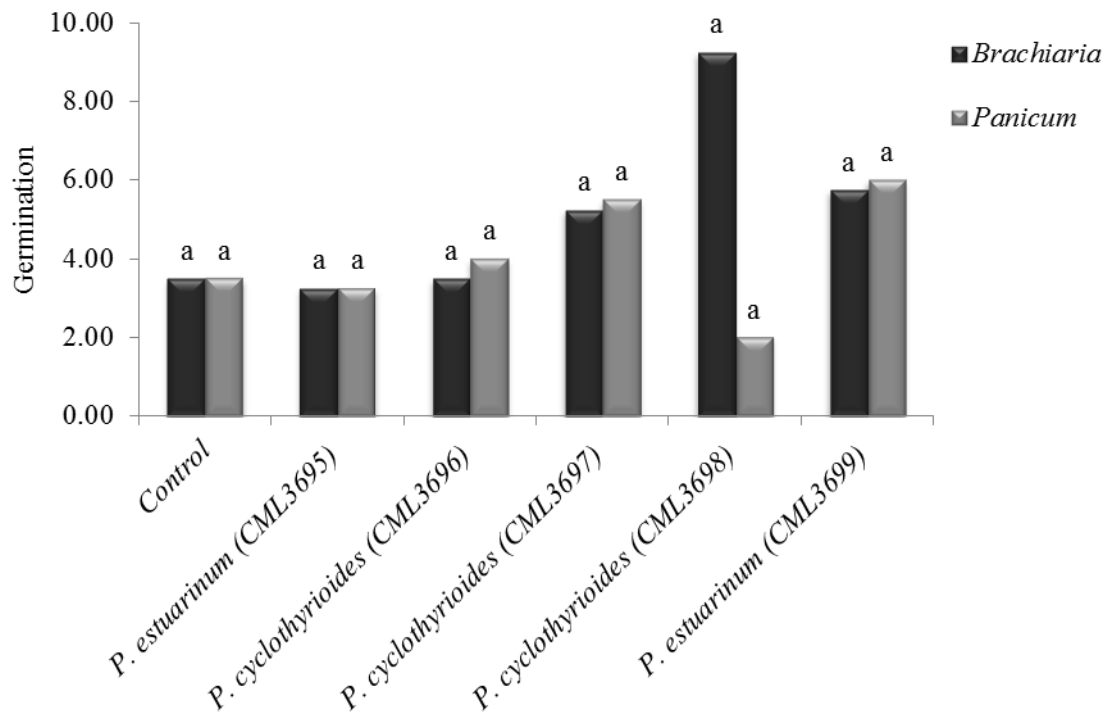
Treatment	-0.35 MPa	-0.60 MPa	-0.80 MPa	-1.0 MPa	-1.2 MPa
<i>P. estuarinum</i> (CML3695)	1.60 ± 0.25 <sup>Aa</sup>	1.80 ± 0.02 <sup>Aa</sup>	1.84 ± 0.01 <sup>Aa</sup>	1.66 ± 0.08 <sup>Aa</sup>	1.72 ± 0.08 <sup>Aa</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3696)	1.66 ± 0.06 <sup>Aa</sup>	1.83 ± 0.11 <sup>Aa</sup>	1.85 ± 0.08 <sup>Aa</sup>	1.72 ± 0.01 <sup>Aa</sup>	1.81 ± 0.10 <sup>Aa</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3697)	1.54 ± 0.11 <sup>Aa</sup>	1.73 ± 0.13 <sup>Aa</sup>	1.80 ± 0.16 <sup>Aa</sup>	1.76 ± 0.13 <sup>Aa</sup>	1.76 ± 0.05 <sup>Aa</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3698)	1.45 ± 0.05 <sup>Aa</sup>	1.52 ± 0.08 <sup>Aa</sup>	1.64 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	1.66 ± 0.06 <sup>Aa</sup>	1.65 ± 0.07 <sup>Aa</sup>
<i>P. estuarinum</i> (CML3699)	1.74 ± 0.06 <sup>Aa</sup>	1.81 ± 0.03 <sup>Aa</sup>	1.86 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	1.79 ± 0.05 <sup>Aa</sup>	1.76 ± 0.12 <sup>Aa</sup>

Data expressed as mean of replicates ± standard deviation. Means with different letters are significantly different at P<0.005. A = analyzed variable fungi; a = analyzed variable osmotic potential.

#### **Evaluation of the germination of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *Panicum maximum* BRS Tamani and development of plants from these seeds inoculated with endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium***

The germination of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *Panicum maximum* cv. BRS Tamani, for the five evaluated fungi, are shown in Figure 1. No significant difference was observed for the germination of the seeds in relation to the evaluated fungi, although there was an increase in the number of germinated seeds, in relation to the control, inoculated with the fungi CML3697, CML3698 and CML3699 for *Brachiaria* and with fungi CML3697 and CML3699 for *Panicum*.

Figure 1 - Number of germinated seeds of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *Panicum maximum* cv. BRS Tamani inoculated with endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium*.



Data expressed as mean of replicates. Means with the same letter do not differ statistically from each other at  $P < 0.05$ .

For the development of the plants from these seeds, for *Brachiaria*, no significant differences was observed for aerial and root length and green and dry weight of aerial and root, in relation to evaluated fungi (Table 3), although gain of plant mass was higher than control in the seeds inoculated with fungi CML3695, CML3696 and CML3698.

For *Panicum*, also, no significant differences in aerial and root length was observed in relation to the evaluated fungi, although the size of the plants was much higher than the control in the seeds inoculated with all five fungi. However, in relation to the plant mass gain (green and dry weight of the aerial part and root), a significant difference was observed in the seeds inoculated with the fungi CML3695, CML3698 and CML3699 (Table 4).

Table 3 - Development of plants of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu inoculated with endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium*.

Treatment	Aerial Length (cm)	Root Length (cm)	Green Weight Aerial (g)	Dry Weight Aerial (g)	Green Weight Root (g)	Dry Weight Root (g)
Control	33.51 ± 10.78 <sup>a</sup>	39.18 ± 13.88 <sup>a</sup>	1.23 ± 0.68 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.63 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.10 <sup>a</sup>
<i>P. estuarinum</i> (CML3695)	32.34 ± 20.43 <sup>a</sup>	35.07 ± 29.75 <sup>a</sup>	1.92 ± 2.52 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.47 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.85 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.18 <sup>a</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3696)	36.68 ± 9.86 <sup>a</sup>	36.34 ± 9.82 <sup>a</sup>	1.49 ± 0.94 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.47 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.10 <sup>a</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3697)	31.99 ± 6.43 <sup>a</sup>	31.76 ± 7.28 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.10 <sup>a</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3698)	34.48 ± 5.14 <sup>a</sup>	35.15 ± 5.64 <sup>a</sup>	1.07 ± 5.64 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.05 <sup>a</sup>
<i>P. estuarinum</i> (CML3699)	31.13 ± 7.25 <sup>a</sup>	28.22 ± 1.44 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.32 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.06 <sup>a</sup>

Data expressed as mean of replicates ± standard deviation. Means with the same letter do not differ statistically from each other at P < 0.05.

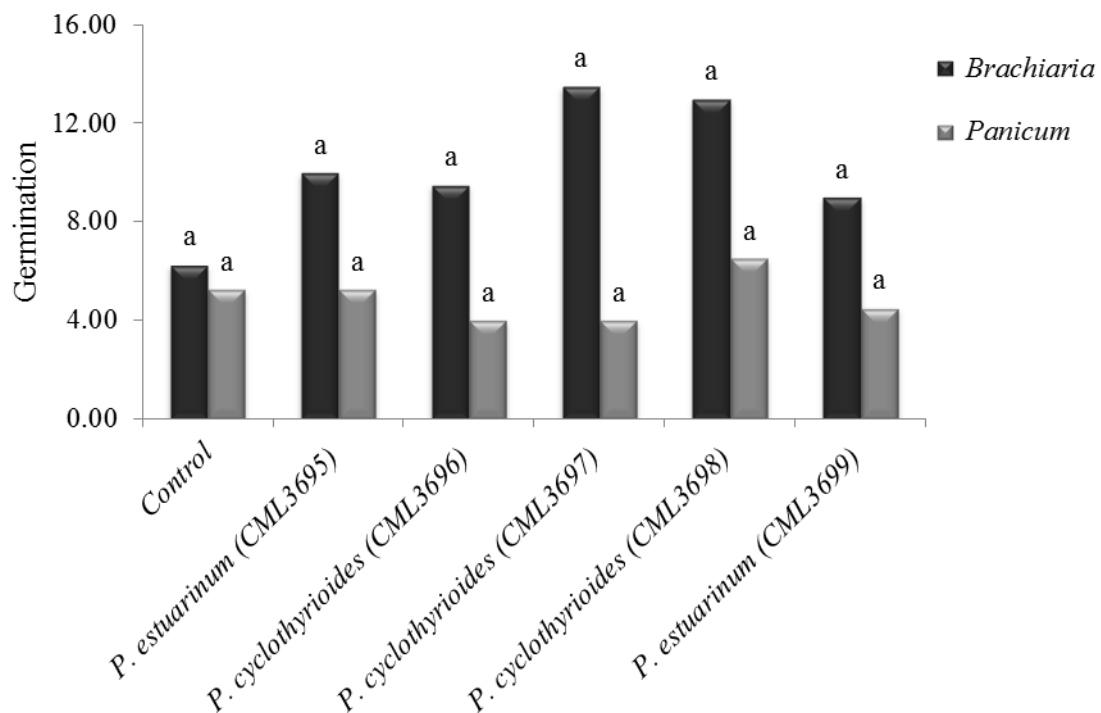
Table 4 - Development of plants of *Panicum maximum* cv. BRS Tamani inoculated with endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium*.

Treatment	Aerial Length (cm)	Root Length (cm)	Green Weight Aerial (g)	Dry Weight Aerial (g)	Green Weight Root (g)	Dry Weight Root (g)
Control	19.68 ± 10.02 <sup>a</sup>	14.34 ± 6.70 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.04 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.09 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.02 <sup>a</sup>
<i>P. estuarinum</i> (CML3695)	32.04 ± 12.91 <sup>a</sup>	31.68 ± 15.05 <sup>a</sup>	1.28 ± 1.05 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.60 ± 0.50 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.08 <sup>a</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3696)	27.15 ± 14.09 <sup>a</sup>	30.14 ± 17.90 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.30 <sup>b</sup>	0.17 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.54 ± 0.45 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.14 <sup>a</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3697)	32.51 ± 2.04 <sup>a</sup>	31.17 ± 3.10 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.46 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.55 ± 0.37 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.06 <sup>a</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3698)	40.20 ± 7.51 <sup>a</sup>	52.72 ± 14.00 <sup>a</sup>	2.08 ± 0.65 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.15 <sup>b</sup>	2.44 ± 1.87 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.20 <sup>a</sup>
<i>P. estuarinum</i> (CML3699)	42.96 ± 5.48 <sup>a</sup>	48.79 ± 6.03 <sup>a</sup>	2.63 ± 1.12 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.04 ± 1.35 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.14 <sup>a</sup>

Data expressed as mean of replicates ± standard deviation. Means with different letters are significantly different at P<0.05.

The data of the germination of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *Panicum maximum* cv. BRS Tamani, for the five evaluated fungi under water stress, are shown in Figure 2. Under water stress, an increase in the germination was observed for both forages, in relation to the experiment without water stress. It can be observed that, for *Brachiaria*, water stress interfered positively in the number of germinated seeds inoculated with all five fungi, although no statistical difference was observed. For *Panicum*, except for the seeds inoculated with the fungus CML3698, all other seeds inoculated with the other four fungi (CML3695, CML3696, CML3697 and CML3699), the number of germinated seeds was less than or equal to the control, and also, no statistical difference was observed.

Figure 2 - Number of germinated seeds of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *Panicum maximum* cv. BRS Tamani inoculated with endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* under water stress of 6 days.



Data expressed as mean of replicates. Means with the same letter do not differ statistically from each other at  $P < 0.05$ .

For the development of plants under water stress, for *Brachiaria*, no significant difference was observed for all the variables analyzed in relation to the evaluated fungi, although an increase, in relation to the control, could be observed in the size of the root of the seeds inoculated with fungi CML3695, CML3696, CML3698 and CML3699 (Table 5).

The same results were observed for *Panicum*. However, some variables had an increase in their values, in relation to the control, such as shoot and root size when inoculated with fungi CML3695, CML3696 and CML3698, and increase of the plant mass (green weight of the aerial part and root) when inoculated with the fungus CML3699 (Table 6).

Table 5 - Development of plants of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu inoculated with endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* under water stress of 6 days.

Treatment	Aerial Length (cm)	Root Length (cm)	Green Weight Aerial (g)	Dry Weight Aerial (g)	Green Weight Root (g)	Dry Weight Root (g)
Control	34.77 ± 10.39 <sup>a</sup>	29.43 ± 4.86 <sup>a</sup>	2.57 ± 2.20 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.54 <sup>a</sup>	3.03 ± 2.19 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.62 <sup>a</sup>
<i>P. estuarinum</i> (CML3695)	32.30 ± 2.12 <sup>a</sup>	32.00 ± 4.17 <sup>a</sup>	1.73 ± 0.51 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.15 ± 0.90 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.14 <sup>a</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3696)	31.93 ± 1.94 <sup>a</sup>	33.53 ± 3.88 <sup>a</sup>	1.97 ± 0.32 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.07 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.01 <sup>a</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3697)	20.78 ± 12.79 <sup>a</sup>	11.30 ± 14.34 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.70 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.20 ± 0.82 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.14 <sup>a</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3698)	31.35 ± 4.74 <sup>a</sup>	30.55 ± 1.40 <sup>a</sup>	1.45 ± 0.47 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.80 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.11 <sup>a</sup>
<i>P. estuarinum</i> (CML3699)	31.05 ± 6.26 <sup>a</sup>	30.95 ± 3.90 <sup>a</sup>	1.45 ± 0.77 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.83 ± 1.18 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.20 <sup>a</sup>

Data expressed as mean of replicates ± standard deviation. Means with the same letter do not differ statistically from each other at P < 0.05.

Table 6 - Development of plants of *Panicum maximum* cv. BRS Tamani inoculated with endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* under water stress of 6 days.

Treatment	Aerial Length (cm)	Root Length (cm)	Green Weight Aerial (g)	Dry Weight Aerial (g)	Green Weight Root (g)	Dry Weight Root (g)
Control	26.33 ± 6.28 <sup>a</sup>	25.50 ± 4.12 <sup>a</sup>	1.96 ± 0.41 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.63 ± 0.79 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.22 <sup>a</sup>
<i>P. estuarinum</i> (CML3695)	28.40 ± 21.12 <sup>a</sup>	24.08 ± 17.07 <sup>a</sup>	1.88 ± 1.69 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.45 <sup>a</sup>	1.30 ± 1.18 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.16 <sup>a</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3696)	30.85 ± 9.50 <sup>a</sup>	24.58 ± 8.86 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.53 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.10 <sup>a</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3697)	21.45 ± 15.08 <sup>a</sup>	23.45 ± 16.68 <sup>a</sup>	1.40 ± 1.10 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.34 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.94 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.20 <sup>a</sup>
<i>P. cyclothyrioides</i> (CML3698)	23.68 ± 15.78 <sup>a</sup>	27.48 ± 19.36 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.82 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.60 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.49 <sup>a</sup>
<i>P. estuarinum</i> (CML3699)	23.55 ± 16.36 <sup>a</sup>	23.13 ± 15.48 <sup>a</sup>	3.45 ± 2.77 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.39 <sup>a</sup>	2.83 ± 2.85 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.29 <sup>a</sup>

Data expressed as mean of replicates ± standard deviation. Means with the same letter do not differ statistically from each other at P < 0.05.



## DISCUSSION

The influence of the osmotic potential on the growth of the endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* is due to the fact that the method of inoculation is by osmotic conditioning (MACHADO et al., 2012). With this, we can infer that the longer these seeds stay in contact with the mycelium of the fungi, without germinating, the greater the chance of colonization of these seeds by these fungi. In the present work, we did not observe a significant difference between the fungal mycelial growth rate (MGRI) and the different osmotic potentials tested. We chose to modify the PDA medium with the highest osmotic potential value (-1.2 MPa). Machado et al. (2007) evaluated the effect of hydric restriction on mycelial growth of *Colletotrichum gossypii* var *cephalosporioides* and *Colletotrichum gossypii* associated with cotton seeds, and observed that the mycelial growth index of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* was not affected by the solutes (NaCl and Mannitol) and water potentials evaluated, and that, therefore, modified Mannitol medium would be a solution to multiply these leaks for inoculation in cotton seeds. Reis et al. (2014) evaluated the effect of water restriction in agar medium on the germination of soybean seeds inoculated with *S. sclerotiorum* on osmotic potentials of -0.3, -0.6 and -0.9 MPa promoted by the use of mannitol and NaCl solutes at different times of exposure to the pathogen (6, 12, 18, 24 and 30 hours) and the possibility of storage of the inoculated seeds. With the results obtained, it was possible to observe that the addition of mannitol to the PDA culture medium in the osmotic potentials -0.3, -0.6 and -0.9 MPa, and NaCl, -0.3 and -0.6 MPa, did not impact the mycelial growth of *S. sclerotiorum*; and also that the solutes used up to the osmotic potential -0.9 MPa did not interfere with the germination of soybean seeds, thus concluding that the viability of the seeds is maintained after storage of these seeds in water-restricted medium. In the present work, it can be observed that the seeds inoculated with the endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* remained viable and germinated after being kept in medium with osmotic potential of -1.2MPa for up to 72h.

In this study, we examined the inoculation of *B. brizantha* cv. Marandu and *P. maximum* cv. BRS Tamani by endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium*, previously isolated from the same genera of forage grasses, and also, we examined the germination of these seeds and the development of the plants from these inoculated seeds. The results showed that, although no significant difference was observed in the germination of these seeds, the number of seeds germinated in relation to the control for *Brachiaria* was higher in the seeds

inoculated with fungi CML3697, CML3698 and CML3699, and for *Panicum*, in seeds inoculated with fungi CML3697 and CML3699. These results can be explained due to the low percentage of germination of these forage seeds, which varies from 40-60%, even more when they are seeds harvested from the plants, which was the case of the seeds used in this study. However, we can affirm, with these results, that the inoculation of these seeds by endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* can stimulate a greater germination of these seeds.

However, for the development of the plants from these seeds, for *Brachiaria*, even though no significant difference was observed between the fungi and the evaluated variables, there was an increase in plant size and in the gain of plant mass in the seeds inoculated with fungi CML3695, CML3696 and CML3698. For *Panicum* no significant difference was observed in the aerial part length and root length, although the aerial part length and root length were higher in the inoculated seeds with all five fungi, in relation to the control, however in the variables green and dry weight of aerial part and root, that is, gain of plant mass, it is possible to observe a significant difference in the seeds inoculated with the fungi CML3695, CML3698 and CML3699. These results also can indicate that seeds inoculated with these endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* originate more vigorous and developed plants.

Results similar to ours were found by Sánchez-López et al. (2018) who evaluated the endophyte microbiome of *Crotalaria pumila* over three generations to better understand the colonization of the plant by the endophyte, seed, *Methylobacterium* sp. Cp3 (a strain detected in the seeds of *C. pumila* in three successive generations, showing that it is a more dominant member of the community), and observed that seeds can transmit vertically endophytic microorganisms that can help the next generations to deal with environmental stresses, through mechanisms still poorly understood, besides observing that when inoculated in the soil at the moment of flowering, the Cp3 strain migrated from the soil to the seeds. This strain also showed genetic potential, *in vitro*, to promote seed germination and seedling development. A genus, well studied, of endophytic fungi transmitted by seeds are those belonging to the genus *Epichloë*, reported mainly by helping their host plants (mainly grasses) in promoting growth and stress mitigation, directly or indirectly (GUNDEL et al., 2017; KAUPPINEN et al., 2016).

A novelty, which with specific studies, can be applied to our results, is the innovation developed by Embrapa Soja, in partnership with Total Tecnologia, which promotes the increase in biomass production and protein content of *Brachiaria* grass (HUNGRIA et al.,

2010). The technology consists in the inoculation of grass with Azototal, the first commercial product with registration for *Brachiaria*. It is an inoculant that contains strains selected from the bacterium *Azospirillum brasilense*. The inoculation with Azototal resulted in a 15% increase in the biomass production of *Brachiaria* and 25% in the total protein content, compared to the plots that did not receive the product. The main effect of this microorganism is the production of phytonutrients, which result, mainly, in considerable increases in the biomass of roots. With higher root growth, the forage's ability to exploit the soil in search of nutrients and water is amplified and allows even greater use of applied fertilizer. The recovery of areas with degraded pastures of *Brachiaria*, using the combination of nitrogen fertilizer and *Azospirillum* can bring, with low cost to the farmer, a great impact to Brazilian agriculture, not only in the greater production of biomass, but also through the improvement in and to provide environmental benefits by encouraging the sequestration of carbon from the atmosphere by increasing the production of forage biomass, estimated at approximately 100 kg of carbon per hectare per year (C/ha/year). The carbon absorbed by the plant is converted into biomass, so to generate more biomass, the plant removes more carbon from the atmosphere (EMBRAPA SOJA, 2018).

We emphasize here the importance, already highlighted by Shahzad et al. (2018), of further studying these plant endophytes because they are concomitant partners throughout all stages of plant development, including seed germination, root growth, stem and fruiting, besides being of great interest because of the vertical transmission, present the potential to produce several phytohormones, enzymes, antimicrobial compounds and other secondary metabolites, to improve plant biomass and to act directly against biotic and abiotic stresses.

The results of the experiment under water stress can be corroborated by what we know from the literature that both *Brachiaria brizantha* and *Panicum maximum* do not tolerate flooding and/or soaking of the soil, being indicated for use in well drained soils (EMBRAPA, 2018). Therefore, in the present study, we had an increase in seed germination as the days of water restriction increased. The same can be observed by Kelemu et al. (2000) who isolated *Acremonium implicatum* from *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens* CIAT 606 and *B. arrecta* CIAT 16845, and observed that at moderate levels of stress, the presence of *Acremonium implicatum* had no significant effect on the growth of *B. arrecta* CIAT 16845, but under severe water stress, endophytic infected plants maintained better leaf expansion and produced significantly higher leaf biomass than free endophytic fungus plants. An opposite result can be observed in the work of Saeidnia et al. (2018) where they evaluated the genetic potential of

the smooth brome grass for water stress and identified the association between the different traits related to the production of seeds and fodder, and resulted in that the water stress had negative effects on the yield of the seeds and its components, reducing the genotype variation of the measured characteristics. On average, water stress reduced seed and fodder production by 38 and 14%, respectively. However, they could observe that the selection for forage and seed production is also possible both in normal irrigation as well as in water stress environment, since some genotypes showed high yield of seeds and fodder under water stress. Our results resemble those of Xia et al. (2018) where they evaluated the effects of the endophyte *Epichloë gansuensis* on the efficiency of water use, nutrient content and biomass accumulation of *Achnatherum inebrians* under varying water availability, and also examined possible transgenic effects in indicators above. Plants with and without endophyte, from seeds grown in Yuzhong (relatively dry) and Xiahe (relatively wet), both cultivated under limited water conditions. The presence of endophyte increased plant height and chlorophyll content, but decreased leaf number and CO<sub>2</sub> concentration, while increasing other photosynthetic rates. The biomass content, N and P was higher in the plants relatively dry with the endophyte than in plants without the endophytic, but not the content of C and the weight of the root. However, there were almost no significant effects on these factors between plants with and without endophytes in treatment with relatively wet plants. The endophyte increased the efficiency of water use, and also kept plant growth under limited water conditions, improving photosynthetic efficiency and promoting nutrient absorption.

## CONCLUSION

It was possible, from the results of the present study, to optimize that an osmotically defined medium can be used for seed inoculation with fungi of the genus *Paraconiothyrium*, favoring a longer time of contact of the seeds with fungi. It was also possible to observe that endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium* can stimulate the germination of forage seeds and stimulate the development of the plants from these seeds. However, we suggest additional studies on this fungus-plant interaction and crop rotation with these inoculated fodder, by endophytic fungi of the genus *Paraconiothyrium*.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support and scholarships. To the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Gado de Corte), on behalf of Dr. Liana Jank, for the supply and availability of the seeds used in the work. This work has no conflict of interest.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS, p.131-163. 2002.
- ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**. (Informa Economics FNP: São Paulo). 2008.
- 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.
- EMBRAPA SOJA: *Tecnologia de inoculação incremental a proteína do capim-braquiária em 25%*. Available in: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/31646381/tecnologia-de-inoculacao-incremental-a-proteina-do-capim--braquiaria-em-25>> Access in: 01/02/2018.
- EZRA, D.; STROBEL, G.A. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. **Plant Science**, v. 165, n. 6, p. 1229-1238. 2003.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. **In. 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria**. UFSCar, São Carlos, SP, p.255-258. 2000.
- GAMA, D.S. Fungos endofíticos em *Brachiaria* e *Cynodon*. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola). p. 90. Universidade Federal de Lavras. 2014.
- GRUYTER, J.de.; 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.
- GUNDEL, P. E.; HELANDER, M.; GARIBALDI, L. A.; VÁZQUEZ-DE-ALDANA, B. R.; ZABALGOGEAZCOA, I.; AND SAIKKONEN, K. Direct and indirect effects of the fungal endophyte *Epichloë uncinatum* on litter decomposition of the host grass, *Schedonorus pratensis*. **Plant Ecol.** 218, 1107–1115. 2017. doi: 10.1007/s11258-017-0755-5.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, 331, 413-425. 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.
- HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Divers**, v. 33, p. 163-173. 2008.
- KAUPPINEN, M.; SAIKKONEN, K.; HELANDER, M.; PIRTILÄ, A.M.; AND WÄLI, P. R. *Epichloë* grass endophytes in sustainable agriculture. **Nat. Plants** 2:15224. 2016. doi: 10.1038/nplants.2015.224.

- 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.
- 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, p.16 - 35. 1996.
- KOGEL, K.H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite—what decides? **Current opinion in plant biology**, v. 9, n. 4, p. 358-363. 2006.
- MAIA, N. da C. Fungal endophytes of *Panicum maximum* and *Pennisetum purpureum*: isolation, identification and antifungal potential. 49 p. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras. 2015.
- MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N.; COSTA, M.L.N.; GUIMARÃES, R.M.; MACHADO, C.F. Uso da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.20, p.1-24. 2012.
- MACHADO, A.Q., MACHADO, J.C., VIEIRA, M.D.G.G.C., CASSETARI NETO, D. & SOUZA, M.V. Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira** 32:408-414. 2007.
- MOLINARI, O.G. Grasslands and grasses of Puerto Rico. Rio Piedras: University of Puerto Rico, 167p. (Bulletin, 102). 1952. In: **Produtividade do capim – Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia) em função da lâmina de irrigação e adubação nitrogenada**. 2002. 182p. Tese (Doutorado em Agronomia – Irrigação e Drenagem) – Universidade São Paulo, Piracicaba-SP. 2002.
- MYCOBANK. *Paraconiothyrium*. Disponível em:  
<<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=117319&Fields=All>>  
Acesso em: 10 jan. 2018.
- OLIVEIRA, J.A. Efeito do tombamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). 111 f. **Dissertação** (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. 1991.
- PETRINI, Orlando. Fungal endophytes of tree leaves. In: **Microbial ecology of leaves**. Springer New York, p. 179-197. 1991.
- REIS, G.F. DOS; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L.; HIRATA, L.M.; PONTIM, B.C.A. Viabilidade de armazenamento de sementes de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* em meio com restrição hídrica. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.2, p.168-173. 2014.
- 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.

- SAEIDNIA, F.; MAJIDI, M. M.; MIRLOHI, A. Genetic potential to improve seed and forage yield simultaneously in smooth brome grass under water deficit conditions. **Euphytica**, 214:42. 2018. doi.org/10.1007/s10681-018-2121-7.
- SAXENA, S.; MESHRAM, V.; KAPOOR, N. *Muscodor tigerii* sp. nov. Volatile antibiotic producing endophytic fungus from the Northeastern Himalayas. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 47-57. 2015.
- SHAHZAD, R.; KHAN, A.L.; BILAL, S.; ASAF, S. AND LEE, I.J. What Is There in Seeds? Vertically Transmitted Endophytic Resources for Sustainable Improvement in Plant Growth. **Front. Plant Sci.** 9:24. 2018. doi: 10.3389/fpls.2018.00024.
- SÁNCHEZ-LÓPEZ, A.S.; PINTELON, I.; STEVENS, V.; IMPERATO, V.; TIMMERMANS, J.-P.; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, C.; CARRILLO-GONZÁLEZ, R.; VAN HAMME, J.; VANGRONVELD, J.; THIJS, S. Seed Endophyte Microbiome of *Crotalaria pumila* Unpeeled: Identification of Plant-Beneficial Methylobacteria. **Int. J. Mol. Sci.**, 19, 291. 2018.
- SKERMAN, P.J.; RIVEROS, F. Gramíneas Tropicales. Rome: FAO, 849p. (FAO Producción y Protección Vegetal, 23). 1992. In: **Produtividade do capim – Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia) em função da lâmina de irrigação e adubação nitrogenada**. 2002. 182p. Tese (Doutorado em Agronomia – Irrigação e Drenagem) – Universidade São Paulo, Piracicaba-SP. 2002.
- SUWANNARACH, N. et al. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* AG-2, the causal agent of damping-off by *Muscodor cinnamomi* CMU-Cib 461. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 3171-3177. 2012.
- TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural product reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459. 2001.
- VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v. 56, p. 460 – 472. 2009.
- VERKLEY, G.J.M.; SILVA, M.da.; WICKLOW, D.T.; CROUS, P.W. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. **Studies in Mycology** 50: 323–335. 2004.
- VERKLEY, G.J.M.; DUKIK, K.; RENFURM, R.; GÖKER, M.; STIELOW, J.B. Novel genera and species of *Coniothyrium*-like fungi in *Montagnulaceae* (Ascomycota). **Persoonia** 32, 2014: 25 – 51. 2014.
- VOET, D.; JUDITH G.V.; CHARLOTTE W.P. **Fundamentals of Biochemistry** (Rev. ed.). New York: Wiley. p. 30. ISBN 978-0-471-41759-0. 2001.
- XIA, C.; CHRISTENSEN, M.J.; ZHANG, X.; NAN, Z. Effect of *Epichloë gansuensis* endophyte and transgenerational effects on the water use efficiency, nutrient and biomass accumulation of *Achnatherum inebrians* under soil water deficit. **Plant Soil**. 2018. doi.org/10.1007/s11104-018-3561-5.
- ZHANG, Y.; CROUS, P.W.; SCHOCH, C.L.; HYDE, K.D. *Pleosporales*. **Fungal Diversity** 53: 1–221. 2012.