

**Ocorrência de Fungo Endofítico
Neotyphodium em Sementes de
Azevém Anual do Rio Grande do Sul,
Brasil**



ISSN 1678-2518

Dezembro, 2016

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 238

Ocorrência de Fungo Endofítico *Neotyphodium* em Sementes de Azevém Anual do Rio Grande do Sul, Brasil

Cley Donizeti Martins Nunes
Andréa Mittelman

Embrapa Clima Temperado
Pelotas, RS
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: BR 392, Km 78

Caixa postal 403, CEP 96010-971 - Pelotas/RS

Fone: (53) 3275-8100

www.embrapa.br/clima-temperado

www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê de Publicações da Embrapa Clima Temperado

Presidente: *Ana Cristina Richter Krolow*

Vice-Presidente: *Enio Egon Sosinski Junior*

Secretária: *Bárbara Chevallier Cosenza*

Membros: *Ana Luiza Barragana Viegas, Fernando Jackson, Marilaine Schaun Pelufê, Sonia Desimon*

Revisão de texto: *Bárbara C. Cosenza*

Normalização bibliográfica: *Marilaine Schaun Pelufê*

Editoração eletrônica: *Nathália Coelho Moreira (estagiária)*

Foto de capa: *Cley Nunes*

1ª edição

1ª impressão (2016): 30 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Clima Temperado

N972o Nunes, Cley Donizeti Martins

Ocorrência de Fungo Endofítico *Neotyphodium* em sementes de azevém anual do Rio Grande do Sul, Brasil /

Cley Donizeti Martins Nunes, Andréa Mittelman. -

Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2016.

22 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Clima Temperado, ISSN 1678-2518 ; 238)

1. Fungo. 2. Gramínea forrageira. 3. Azevém.
I. Mittelman, Andréa. II. Título. III. Série.

CDD 632.9

©Embrapa 2016

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos	13
Resultados e Discussão	14
Conclusões	18
Referências	19

Ocorrência de Fungo Endofítico *Neotyphodium* em Sementes de Azevém Anual do Rio Grande do Sul, Brasil

Cley Donizeti Martins Nunes¹
Andréa Mittelman²

Resumo

O fungo endofítico do gênero *Neotyphodium* ocorre nas gramíneas forrageiras de clima temperado, com destaque para festuca (*Festuca arundinacea*) e azevém (*Lolium perene*). Esse fungo se estabelece nos tecidos da planta sem provocar sintomas, sinais ou danos, mas induz alterações fisiológicas vantajosas para o hospedeiro, como resistência aos estresses abióticos e bióticos. O objetivo desse trabalho foi determinar a ocorrência da espécie e os níveis de incidência do fungo endofítico *Neotyphodium* nas sementes de azevém anual (*Lolium multiflorum*) do Rio Grande do Sul. O experimento foi realizado no Laboratório de Clínica Fitossanitária da Estação Experimental Terras Baixas da Embrapa Clima Temperado, localizada no município de Capão do Leão, RS. Os tratamentos constituíram de 14 genótipos, sendo 9 pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Azevém e 5 lotes de cultivares comerciais 'BRS Ponteio L. 26', 'BRS Ponteio L. 27', 'FABC 1', 'LE 284' e 'Barjunbo'. Detectou-se a presença do fungo endofítico *N. occultans* nas sementes de azevém. Os níveis médios

¹ Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

² Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Melhoramento, pesquisadora da Embrapa de Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

de incidência do fungo no banco de germoplasma e nas cultivares comerciais são de 80,6% e 29,0%, respectivamente.

Palavras-chave: *Lolium*, resistência, abiótico.

Occurrence of the Endophytic Fungus in the Annual Ryegrass Seeds from Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract

The endophytic fungus called Neotyphodium occurs in temperate grasses, especially fescue (Festuca arundinacea) and ryegrass (Lolium perenne). This fungus is established in plant tissues without causing any symptoms, signs or damage but induce physiological changes advantageous to the host as resistance to biotic and abiotic stresses. The objective of this work was to determine the occurrence of the species and the levels of incidence of endophytic fungus Neotyphodium in annual ryegrass (Lolium multiflorum) grown in Rio Grande do Sul State. The experiment was carried out in the laboratory of Plant Protection in the Lowlands Experimental Station of Embrapa Temperate Agriculture, located in Capão do Leão municipality. The treatments consisted of 14 genotypes: 9 from the Germplasm Bank and 5 cultivars: 'BRS Ponteio L. 26', 'BRS Ponteio L. 27', 'FABC 1', 'LE 284' and 'Barjunbo'. The design used was completely randomized block with four replications. The presence of endophyte N. occultans in ryegrass seeds was detected. Mean levels of incidence of the pathogen in the germplasm bank and the commercial cultivars are 80.6% and 29.0%, respectively.

Index terms: Lolium, resistance, abiotic.

Introdução

Os fungos que pertencem aos gêneros *Epichloë* e *Neotyphodium* estão entre os muitos tipos dos microrganismos denominados endófitos, em virtude da sua associação simbiótica com as plantas. *Neotyphodium*, em particular, está associado a várias espécies de gramíneas de estação fria das regiões de clima temperado, particularmente aquelas pertencentes aos gêneros *Festuca* e *Lolium*, que são duas forrageiras importantes na alimentação do gado no período de entressafra (MARSHALL et al., 1999; TSAI et al., 1994; VINTON et al., 2001).

O organismo na forma de micélio infecta o tecido desenvolve-se de forma sistêmica, nos espaços intercelulares, sem causar nenhum sintoma, sinais ou danos ao hospedeiro (não patogênica). Durante o período reprodutivo da planta, infecta o óvulo e dessa maneira perpetua-se por gerações da planta hospedeira, por meio das sementes. No entanto, os fungos endófitos induzem alterações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas nas gramíneas hospedeiras, que podem, por sua vez, afetar indivíduos consumidores em vários níveis tróficos (herbívoros, patógenos), decompositores (saprófitos ou necrotróficos) e microbianos mutualistas (fungos micorrízicos) (MALINOWSKI; BELESKY, 2006; OMACINI et al., 2005; ZABALGOGEAZCOA; BONY, 2005).

O gênero *Neotyphodium* pertence ao grupo dos deuteromicetos ou fungos imperfeitos, cuja característica comum é a ausência ou rara ocorrência de reprodução sexual, ou a fase de reprodução sexual ainda não descoberta (KRUGNER et al., 1995). Nos fungos que estabelecem interação simbiótica assintomática, a perda da sexualidade torna-se necessária em longo prazo, em contraste às associações que têm meios de reprodução sexual e assexuada (WILKINSON; XCHARDL, 1997 citado por MALINOWSKI; BELESKY, 2006).

Esse fungo foi pela primeira vez observado em festuca (*Festuca arundinacea*) e classificado como *Epichloë typhina* (BACON et al., 1977), depois por G. Morgan-Jones e W. Gams (1982) como *Acremonium coenophialum*, e finalmente renomeado para *Neotyphodium coenophialum* por Glenn et al. (1996) (MALINOWSKI et al., 2005). Duas décadas passadas, sete gêneros de fungo endofítico de família Clavicipitaceae (Ascomycetes), associados às gramíneas, foram identificados e são conhecidos também por produzirem vários tipos de alcalóides tóxicos (WHITE, 1994; WHITE; TEDDY, 1998; MALINOWSKI et al., 2005). Os endófitos *Neotyphodium* mais amplamente conhecidos são *N. coenophialum*, *N. lolii* e *N. uncinatum*, que colonizam festuca (*Festuca arundinacea*), azevém perene (*Lolium perenne*) e festuca-de-prado (*F. pratensis*), respectivamente (MALINOWSKI et al., 2005). Recentemente denominado em azevém anual (*Lolium multiflorum*) de *N. occultans* (NOON et al., 2000 citado por DE BATTISTA, 2005).

O fungo é encontrado comumente nas plantas de *Festuca arundinacea* e foi pesquisado por muitos anos, o que levou a concluir que é o causador de doença no gado conhecida como intoxicação por festuca. Por outro lado, é benéfico para a planta hospedeira por aumentar a resistência (tolerância) a diversos estresses bióticos (diferentes espécies de insetos, doenças e nematóides) e abióticos (seca e toxidez por nutriente como ferro e alumínio). Pesquisas recentes mostram a variabilidade do fungo pela presença de raças não tóxicas aos animais nas coleções da Nova Zelândia, Geórgia e Arkansas (EUA), dando grande impulso nas pesquisas por capitalizar as vantagens dos benefícios conferidos à planta pelo fungo. (FRIBOURG; WALLER, 2005; MALINOWSKI et al., 2005; MALINOWSKI; BELESKY, 2006; ZABALGOGEAZCOA et al., 1998).

Em termos de resistência epidemiológica, o endofítico não tem efeito direto na genética da resistência, ou seja, não induz a planta a resistir à infecção causado pelo parasito, mas de forma a aumentar

a tolerância ao patógeno. Welty et al., 1993, mostraram que presença do endófito, *Acremonium coenophialum*, não exerce influência na expressão da resistência da festuca alta à ferrugem-do-colmo (*Puccinia graminis* subsp. *graminicola*). Estes autores afirmam que diferentes clones de festuca infectado pelo endofito tem respostas fisiológicas diferentes. Aparentemente, determinadas interações hospedeiro-endófito produz respostas muito específicas ou seja, nem todas as plantas infectadas respondem da mesma maneira aos patógenos.

As plantas de azevém perene infectadas com endófito (*Neotyphodium lolii*), em relação às plantas livres desse organismo, podem apresentar maior vigor de plântula, perfilhamento, rendimento e persistência. Nas populações velhas e adaptadas, a frequência média de plantas infectadas é de 90%. Os endófitos de festuca e azevém perene produzem alcalóides, que são tóxicos para os ruminantes que consomem esses tipos de forragem (FLETCHER, 1993, STUEDEMANN; HOVELAND, 1988). Os principais alcaloides tóxicos (ergovalina e lolitrem B) produzidos pelo fungo têm seus picos de concentrações na forragem, nas estações de verão e outono (QUIGLET, 2000; REED et al., 2000, 2001; WOODBURN et al, 1993 citados por REED et al., 2005).

A intoxicação por festuca se manifesta no gado bovino, ovino e equino, principalmente na época de temperaturas mais elevada. Os sintomas são diversos e vão desde a elevação da temperatura corporal (retal), inapetência, perda do brilho do pelo, número elevado de abortos e até gangrenas em extremidades como orelhas e cola. O sintoma mais sutil é a redução do ganho médio de peso em aproximadamente de 50%, e foi associado à baixa fertilidade na criação de ovelha e de cordeiro. (REED et al., 2005; ZABALGOGEAZCOA et al., 1998).

Os problemas de toxicose com gado bovino, equino e ovino, causados por consumo de pastos de *Festuca arundinacea* e *Lolium perene* infectados por *N. coenophialu* e *N. lolii*, respectivamente, têm uma

forte repercussão na economia dos pecuaristas dos Estados Unidos e Nova Zelândia. Entretanto, na Europa e América do Sul, não há relatos ou são muito poucos casos (OLIVEIRA et al., 1996; RAYNAL, 1991 citado por ZABALGOGEAZCOA et al., 1998; DE BATISTA, 2005).

O baixo número de casos de endófitos tóxicos na Europa e América do Sul pode ser explicado, nesse paradoxo, pela presença de alta diversidade botânica nas pastagens, que dilui as toxinas endolíticas. Além disso, o azevém perene é uma gramínea forrageira muito mais importante do que a festuca, por sua excelente quantidade de forragem e qualidade durante o período crítico de outono-inverno, entretanto, a maioria das cultivares de azevém não estão infectados, ou suas taxas de infecção são baixas (DE BATISTA, 2005; ZABALGOGEAZCOA; BONY, 2005).

Resultados preliminares na Argentina indicam que as populações naturais tanto de azevém anual como *Bromus auleticus* apresentam altas frequências de níveis de infecção de endófitos (IANNONE et al., 2009; MEDVESCIGH et al., 2004), sugerindo uma possível vantagem adaptativa conferida pelos simbiontes fúngicos. Por outro lado, estudos realizados com essas duas espécies infectados indicam que essas associações não produzem ergovalina, ergovaniline, ergocorine, ergometrina e lolitrem B, portanto não gerariam toxicidade para o gado, mas seriam capazes de produzir outros alcalóides como peramina e/ou lolinas. Esses metabólitos são responsáveis pela tolerância/repelência a insetos herbívoros e normalmente são produzidas por *N. coenophialu* e *N. lolii*, que infectam respectivamente *Festuca arundinacea* e *Lolium perene* (SUGAWARA et al., 2006; TEPASKE et al., 1993).

As plantas forrageiras com maiores taxas de infecção foram encontradas em locais que tinham sido pastejados ou utilizados intensivamente pelos animais. Portanto, existe a hipótese de que o manejo do pastejo intenso pode ser considerado uma força

indutora para maiores taxas de infecção de endofíticos na pastagem seminatural da Dinamarca. (JENSEN; ROULUND, 2004).

A lista de gramíneas hospedeiras europeias com endófitos de *Epichloë* cresceu durante os últimos cinco anos na Finlândia, França e Espanha. No levantamento francês, foram analisadas 237 espécies de gramíneas europeias quanto à presença de micélio endofítico. Sementes de 22 espécies foram encontradas com infecção. No entanto, 39 espécies não foram contaminadas com o fungo, mas já haviam sido relatadas como hospedeiros endofíticos. Assim, cerca de 25% dessas 237 espécies forrageiras europeias são hospedeiros potenciais para endófitos (LEYRONAS; RAYNAL, 2001 citado por ZABALGOGEAZCOA; BONY, 2005).

Em um levantamento no ecossistema semiárido no oeste da Espanha, em 22% das 49 espécies de gramíneas analisadas foram encontradas as espécies de *Neotyphodium* ou *Epichloë* (ZABALGOGEAZCOA et al., 1998). Essa taxa de espécies de forrageiras hospedeiras está próxima ao relatado no levantamento francês (25%). *Festuca* e *Lolium* foram os gêneros que abrangiam a maioria das espécies na França, Espanha e Finlândia. (SAIKKONEN et al., 2000 citado por ZABALGOGEAZCOA; BONY, 2005).

Na Austrália, nas pastagens de azevém perene monitoradas, em propriedades afetadas, a frequência média de infecção por endófito foi de 85%. A média de ergovalina e lolitrem B foi de 1,75 mg kg⁻¹ na matéria fresca e 3,02 mg kg⁻¹ na matéria seca, apresentando concentrações médias de 0,18 mg kg⁻¹ e 1,36 mg kg⁻¹ nas fezes dos animais afetados, respectivamente. As ovelhas exibiram leve taxa de crescimento (REED et al., 2005).

Na avaliação das sementes de 11 cultivares comerciais de *Festuca* (*Festuca arundinacea*) da Argentina com infecção por *N. coenophialum* e duas testemunhas, verificou-se quatro cultivares

infectadas com níveis de 17% a 72%, e as testemunhas com 97% (ZABALGOGEAZCOA et al., 1998).

Na Turquia, no levantamento de 76 amostras de sementes de 10 gêneros de gramíneas nativas, o fungo endofítico foi encontrado em somente quatro delas (TUNALI et al., 2000).

Poucos estudos na região do Cone Sul americano relatam a frequência dessas associações em populações naturais ou em cultivares comerciais de azevém anual (*Lolium multiflorum*). Também é escassa a informação quanto ao impacto dessas associações sobre a resposta da gramínea hospedeira aos diferentes fatores (bióticos, abióticos e antrópicos) que afetam seu crescimento e comportamento agrônomo. Como o azevém é uma forrageira muito importante para Argentina, e suas populações espontâneas são altamente infestadas, existe um forte interesse da pesquisa por *Neotyphodium*. (DE BATISTA, 2005).

O objetivo desse trabalho foi observar ocorrência do fungo endofítico *Neotyphodium* nas sementes de azevém anual, assim como na constatação da espécie e avaliar os níveis de incidência nas sementes dos genótipos do banco de germoplasma da Embrapa e das cultivares comerciais.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Clínica Fitossanitária da Estação Experimental Terras Baixas da Embrapa Clima Temperado, localizada no município de Capão do Leão, RS.

Os tratamentos constituíram de 14 genótipos de azevém anual, sendo 9 pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da espécie (LOL 135, 136, 206, 207, 209, 212, 213, e 5 lotes de cultivares

comerciais ('BRS Ponteio L. 26', 'BRS Ponteio L. 27', 'FABC 1', 'LE 284' e 'Barjunbo').

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com quatro repetições. Cada parcela foi constituída de 25 sementes.

Para analisar a ocorrência do fungo endofítico, as sementes foram embebidas em solução de hidróxido de sódio a 5% e mantidas por um período de 16-18 horas, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas em água corrente retiradas as respectivas glumas, coradas com Azul de Amann e comprimidas entre a lâmina e lamínula microscópica, para então ser verificada ao microscópio estetoscópio a presença do fungo na camada de aleurona (ZABALGOGAEZCOA et al., 1998). Para auxiliar na identificação também foram feitas lâminas do tecido das folhas, observado ao microscópio, usando-se o método das descrições e ilustrações (MORGAN-JONES, 1982; WHITE; MORGAN-JONES, 1987, citado por ZABALGOGAEZCOA et al., 1998; AN et al., 1993; SUGAWARA et al., 2006).

Quanto à avaliação dos dados, foram realizadas as análises de variância, coeficiente de variância e teste de comparação múltipla de médias de Duncan ($p \leq 0,05$), utilizando-se o programa SAS, versão 9.1.3.

Resultados e Discussão

O azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) é muito cultivado por muitos anos na região Sul do Brasil como pastagem de inverno ou para ceifa por ser uma gramínea de alta aceitação pelos animais e conter elevado teor de proteína, alta digestibilidade e composição

mineral equilibrada, e sem haver ocorrência de toxidade aos animais (DE BATISTA, 2005).

Os fungos do gênero *Neotyphodium* e dos *Epichloë* metabolizam os alcaloides tóxicos como ergovalina, lolitrem B e peramina, o que não é relato com azevém anual infectado com *N. occultans*, permitindo diferenciar essa espécie (DE BATISTA, 2005; SUGAWARA et al., 2006).

Nas análises realizadas todos os 14 genótipos de azevém revelaram a presença do fungo endofítico na capa de aleurona das sementes (Figura 1), com poucos septados, não ondulados, entretanto o fungo não foi observado nas folhas.

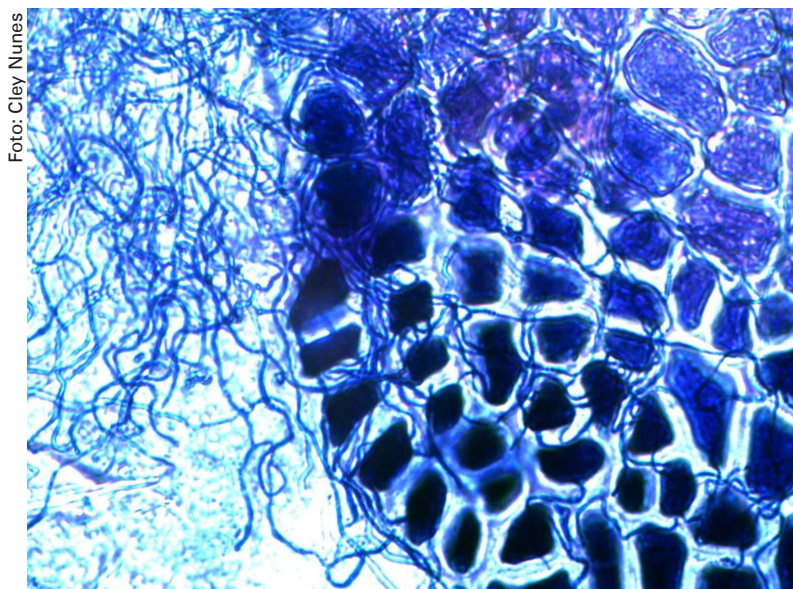


Foto: Cley Nunes

Figura 1. Presença do fungo *Neotyphodium occultans* (a) na capa de alerona; (b) em semente de azevém. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Terras Baixas, Capão do Leão, 2012.

Quanto à localização do fungo endofítico na planta, pode-se diferenciar as espécies de *Neotyphodium*. O *N. coenophialum* ocorre no tecido das folhas, confinado à base da folha (bainha), nas flores, nas sementes, enquanto para o *N. occultans*, que infecta o azevém anual, não se tem informação ou é muito raro identificar nas folhas, mas ocorre em abundância na semente e no óvulo da flor (DE BATISTA, 2005; SUGAWARA et al., 2006).

O fungo *N. coenophialum* possui características usadas para sua identificação, como aspecto típico mais enrolado, em forma de espiral e altamente septado (AN et al., 1993; SUGAWARA et al., 2006).

O endófito observado nas sementes de azevém anual é pouco ramificado, com largura de 1-2 μm , o que condiz com a descrição original do fungo *N. occultans*. Portanto, pelas características descritas das espécies de endófitos e nas ilustrações, e não havendo registros de intoxicação de animais com azevém anual na Estação Experimental Terras Baixas da Embrapa Clima Temperado, assim como em todo o Rio Grande do Sul, o fungo foi identificado como *N. occultans*.

O fungo foi observado nas sementes de todos os genótipos de azevém (Figura 1). A incidência média do endófito variou de 4% a 91% das sementes (Tabela 1).

Observou-se que os materiais procedentes do banco de germoplasma obtiveram maior incidência de sementes com o fungo quando comparadas com as cultivares comerciais, apresentando médias de 80,6% e 29,0%, respectivamente. Houve diferença significativa entre esses dois grupos, com exceção dos genótipos LOL 209, LOL 206 e LOL 213, os quais diferiram de 'BRS Ponteio L26'.

Esses resultados obtidos para os genótipos provenientes do banco de germoplasma se aproximam do monitoramento das pastagens de azevém perene contaminadas da Austrália, que foi de 85% (REED et al., 2005).

O motivo de ocorrer baixa taxa de infecção nas cultivares comerciais pode ser a perda da viabilidade do fungo, devido ao armazenamento das sementes durante a preparação e comercialização. Conforme Willians et al. (1984) citado por Zabalgogezcoa et al. (1998), quando as sementes de festuca infectadas são armazenadas sob temperatura relativamente alta, a viabilidade do fungo diminui mais rapidamente do que a semente. Um dos métodos usados para eliminar *N. coenophialum* de sementes consiste em armazenar as sementes em temperatura ambiente por um período superior a um ano.

Essa variação no nível de infecção entre as cultivares comerciais pode ter surgido mediante a manipulação de lotes de sementes durante a seleção de linhagens e processos (ou) de multiplicação (DE BATISTA, 2005).

Tabela 1. Incidência média do fungo endofítico *Neotyphodium occultans* nas sementes de 14 genótipos de azevém. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Terras Baixas, Capão do Leão, 2012.

Genótipos	Procedência	Incidência (%)		
LOL212	BG1	(%)	*a	
LOL 207	BG	90,0	a	
LOL 136	BG	90,0	a	
Azevém comum	BG	87,0	a	
LOL 135	BG	84,0	a	
BRS Ponteio Sede 2008	BG	79,0	a	
LOL 209	BG	70,0	a	b
LOL 206	BG	68,0	a	b
LOL 213	BG	66,0	a	b
BRS Ponteio L. 26	MC2	50,0	b	c
BRS Ponteio L. 27	MC	34,0	c	d
FABC 1	MC	34,0		d
LE 284	MC	23,0		d
Barjunbo	MC	4,0		e
CV		5,28		

1- BG = Banco de Germoplasma; 2 MC = Material Comercial; *Médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Duncan (0,05%)

O ciclo de vida desse fungo é estritamente endofítico. Na natureza, o mecanismo de transmissão horizontal de *N. coenophialum* é pouco conhecido. Portanto, os resultados obtidos nesse estudo indicam que as sementes desses genótipos são derivadas de plantas infectadas, ou seja, propagação clonal por meio dos meristemas florais, consequentemente em decorrência de uma transmissão vertical ou matrilinear. Os genótipos podem transmitir horizontalmente através de esporos sexuais para prosseguir no ciclo de vida, o que também requer um terceiro indivíduo (mosca *Phorbia phrenione*) para intermediar o cruzamento fúngico (SPANGENBERG et al., 2005).

Estudos recentes mostram as vantagens agronômicas da associação simbiótica do fungo endofítico com as gramíneas nos diferentes ecossistemas. Portanto, o estudo desse recurso torna-se valioso para o sistema de produção de forragens no período de inverno.

Conclusão

A presença do endofítico *N. occultans* nas sementes de azevém no Rio Grande do Sul é uma realidade.

Os níveis médios de incidência do fungo no banco de germoplasma e nas cultivares comerciais são de 80,6% e 29,0%, respectivamente.

Referências

AN, Z. Q.; SIEGEL, M. R.; HOLLIN, W.; TSAI, H. F.; SCHMIDT, D.; SCHARDL, C. L. Relationships among non-*Neotyphodium* sp. fungal endophytes in five grass species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1540-1548, 1993.

DE BATTISTA, J. *Neotyphodium* research and application in South America. In: CRAIG, A. R.; WEST, C. P.; SPIERS, D. E. **Neotyphodium in cool-season grasses**. Ames: Blackwell, 2005. p. 64-71. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470384916>>. Acesso em: 25 out. 2016.

FLETCHER, L. R. Grazing ryegrass endophyte associations and their effect on animal health and performance. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *NEOTYPHODIUM*/GRASS INTERACTIONS, 2., 1993. **Proceedings...** 1993. p. 115-120. Editors: D. E. Hume, G. C. M. Latch, Herrick Sydney Easton.

FRIBOURG, H. A.; WALLER, J. C. *Neotyphodium* research and application in the USA. In: CRAIG, A. R.; WEST, C. P.; SPIERS, D. E. **Neotyphodium in cool-season grasses**. Ames: Blackwell, 2005. p. 3-22. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470384916>>. Acesso em: 25 out. 2012.

KRUGNER, T. L.; AMORIM, L. M. Fungos. In: FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. M. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 46-95.

IANNONE, L. J.; CABRAL, D.; SCHARDL, C. L.; ROSSI, M. S. Phylogenetic divergence, morphological and physiological differences distinguish a new *Neotyphodium* endophyte species in the grass *Bromus auleticus* from South America. **Mycologia**, v. 101, p. 336–347, 2009.

JENSEN, A. M. D.; ROULUND, N. Occurrence of *Neotyphodium* endophytes in permanent grassland with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in Denmark. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 104, n. 3, p. 419-427, 2004

MALINOWSKI, D. P.; BELESKY, D. P.; LEWIS, G. C. Abiotic stresses in endophytic grasses. In: CRAIG, A. R.; WEST, C. P.; SPIERS, D. E. **Neotyphodium in cool-season grasses**. Ames: Blackwell Publishing, 2005. p. 187-199. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470384916>>. Acesso em: 25 out. 2012.

MALINOWSKI, D. P.; BELESKY, D. P. Ecological importance of *Neotyphodium* spp. grass endophytes in agroecosystems. **Grassland Science**, v. 52, p. 1-14, 2006.

MEDVESCIGH, J.; MAIDANA, R.; DE BATTISTA, J. P.; SABATINI, E.; COSTA, M. Incidence and infection level of endophyte infection on *Lolium multiflorum* Lam. Naturalized populations in Entre Rios Province, Argentina. *Neotyphodium* SYMPOSIUM, 5. Fayetteville, Arkansas, EUA. **Proceedings....** 2004. p. 23-26. Session II Biology of *Neotyphodium*.

OMACINI, M.; ENRIQUE, J.; CHAENETON, J.; GHERSA, C. M. A hierarchical framework for understanding the ecosystem consequences

of endophyte-grass symbioses. In: CRAIG, A. R.; WEST, C. P.; SPIERS, D. E. **Neotyphodium in cool-season grasses**. Ames: Blackwell Publishing, 2005. p. 141-161. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470384916>>. Acesso em: 25 out. 2012.

REED, K. F. M.; SCRIVENER, C. J.; RAINSFORD, K. A.; WALKER, L. V. *Neotyphodium* research and application in Australia. In: CRAIG, A. R.; WEST, C. P.; SPIERS, D. E. **Neotyphodium in cool-season grasses**. Ames: Blackwell Publishing, 2005. p. 43-54. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470384916>>. Acesso em: 25 out. 2012.

SPANGENBERG, G. C.; FELITTI, S. A.; SHIELDS, K.; RAMSPERGER, M.; TIAN, P.; ONG, E. K.; SINGH, D.; LOGAN, E.; DAVID, E. Gene discovered and microarray based transcriptome analysis of the grass endophyte association. In: CRAIG, A. R.; WEST, C. P.; SPIERS, D. E. **Neotyphodium in cool-season grasses**. Ames: Blackwell Publishing, 2005. p. 43-54. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470384916>>. Acesso em: 25 out. 2012.

STUEDEMANN, J. A.; HOVELAND, C. S. Fescue endophyte: History and impact on animal agriculture. **Journal of Production Agriculture**, v. 1, p. 39-44, 1988.

SUGAWARA, K.; INOUE, T.; YAMASHITA, M.; OHKUBO, H. Distribution of the endophytic fungus, *Neotyphodium occultans* in naturalized Italian ryegrass in western Japan and its production of bioactive alkaloids known to repel insect pests. **Grassland Science**, Tochigi, v. 52, p. 147-154, 2006.

TEPASKE, M. R.; POWELL, R. G.; CLEMENT, S. L. Analyses of selected endophyte-infected grasses for the presence of loline-type and ergot-type alkaloids. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 2299-2303, 1993.

TUNALI, B.; SHELBY, R. A.; MORGAN-JONES, G.; KODAN, M.
Endophytic fungi and ergot alkaloids in native Turkish grasses.
Phytoparasitica, v. 28, n. 4, p. 1-3, 2000.

WELTY, R. E.; BARKER, E. R.; AZEVEDO, M. D. Response of Field-grown tall fescue infected por *Acremonium coenophialum* to Puccinia graminis subsp. Graminicola. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 6, p. 574-575, 1993.

ZABALGOGEAZCOA, I.; BONY, S. *Neotyphodium* research and application in Europe. In: CRAIG, A. R.; WEST, C. P; SPIERS, D. E. **Neotyphodium in cool-season grasses**. Ames, Blackwell Publishing, 2005. p. 23-33. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470384916>>. Acesso em: 25 out. 2012.

ZABALGOGEAZCOA, I.; GARCIA CIUDAD, A.; GARCIA CRIADO, B. Variedades forrageiras de *Festuca arundinacea*. **Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetal**, v. 13, n. 1-2, p. 167-172, 1998.



Clima Temperado

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

