

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos

TIAGO ANDRADE BORGES SANTOS

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DOS COMPLEXOS *STACHYBOTRYS-*
MEMNONIELLA E *PHALANGISPORASPEIROPSIS-WIESNERIOMYCES***

Recife
2015

TIAGO ANDRADE BORGES SANTOS

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DOS COMPLEXOS *STACHYBOTRYS-*
MEMNONIELLA E *PHALANGISPORA-SPEIROPSIS-WIESNERIOMYCES***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Pascholati Gusmão

Recife
2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Santos, Tiago Andrade Borges

Relações filogenéticas dos complexos *Stachybotrys-Memmoniella* e *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces*/ Tiago Andrade Borges Santos– Recife: O Autor, 2015.

50 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Luís Fernando Pascholati Gusmão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2015.

Inclui referências

- 1. Ascomycetos 2. Fungos 3. Filogenia I. Gusmão, Luís Fernando Pascholati (orientador) II. Título**

TIAGO ANDRADE BORGES SANTOS

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DOS COMPLEXOS *STACHYBOTRYS-*
MEMNONIELLA E *PHALANGISPORA-SPEIROPSIS-WIESNERIOMYCES***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Aprovado em: 20 /02 /2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Luís Fernando Pascholati Gusmão /
Universidade Estadual de Feira de Santana

Dr. Alisson Cardoso Rodrigues da Cruz /
Universidade Federal do Oeste da Bahia

Dr. Gladistone Alves da Silva /
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, D. Janilda Andrade Borges Santos e Sr. José Nicodemas Evangelista Santos, pelo apoio incondicional e incentivo;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Fernando Pascholati Gusmão, pela oportunidade proporcionada, pela experiência compartilhada e pelo exemplo dado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de mestrado;

À Universidade Estadual de Feira de Santana, que viabilizou este trabalho por meio da infraestrutura concedida dos Laboratórios de Micologia e de Sistemática Molecular Vegetal;

À Universidade Federal de Pernambuco pelo auxílio disponibilizado para apresentação de resultados parciais no VII Congresso Brasileiro de Micologia;

Ao Núcleo de Excelência em Sistemática e Variabilidade Molecular de Plantas e Fungos (FAPESB), e ao Programa de Pesquisa em Biodiversidade do Semiárido, pelo apoio financeiro;

À BCCM/MUCL Environmental and Applied Mycology, na pessoa do PhD Cony Decock, por disponibilizar alguns isolados em culturas imprescindíveis ao presente estudo;

Aos amigos do Laboratório de Micologia, Alisson Cardoso Rodrigues da Cruz, Carolina Azevedo, Carolina Ribeiro Silva, Davi Augusto Carneiro de Almeida, Jorge Luiz de Andrade Dias, Josiane Santana Monteiro, Lara Emanuele Queiroz de Almeida, Loise Araújo Costa, Myrna Barbosa Fernandes Antunes, Patrícia Oliveira Fiuza, Sheila Miranda Leão Ferreira, Silvana Santos da Silva, Taimy Cantillo Perez e Tasciano dos Santos Santa Izabel pelos momentos descontração e discussão, pelos conselhos e ideias;

A Lara Emanuele Queiroz de Almeida, quem se encarregou de reativar todas as culturas utilizadas neste estudo;

Aos amigos do Laboratório de Sistemática Molecular Vegetal, pelos momentos vivenciados entre extrações, PCRs, sequenciamentos e faxinas;

Aos amigos/colegas que fiz no Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos pela convivência, na alegria e na tristeza, em especial à minha turma do Mestrado 2013, por me suportar durante todo esse tempo.

“A classificação por descendência não pode ser inventada por biólogos, ela pode apenas ser descoberta.”

Theodosius Dobzhansky

RESUMO

Entre os fungos conidiais, os gêneros *Stachybotrys* Corda e *Memnoniella* Höhnelt caracterizam-se pelo modo como os conídios são formados através das fiálides de forma basípeta. Embora *Stachybotrys* e *Memnoniella* sejam considerados gêneros distintos, evidenciando-se pela disposição dos conídios em longas cadeias secas em *Memnoniella* e massas viscosas em *Stachybotrys*, considera-se que esta diferença por si só não exerce influência para separá-los, uma vez que marcadores moleculares sugerem que a disposição dos conídios em mucilagem ou em cadeia sejam estados de caráter derivados. Por outro lado, o complexo *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces* apresenta como características comuns à presença de conídios com formas cônicas e cilíndricas em cadeias conectados por um istmo e conidiogênese do tipo holoblástica. *Phalangispora* e *Wiesneriomyces* possuem conidióforos organizados em esporodóquio com setas, e conídios ramificados e não ramificados, respectivamente. As espécies do gênero *Speiropsis* apresentam conidióforos simples e conídios em cadeias ramificadas ou não. Esse estudo objetivou estabelecer uma filogenia para os complexos *Stachybotrys-Memnoniella* e *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces* utilizando sequências ITS, LSU, β -tubulina 1, β -tubulina 2 de isolados do Semiárido brasileiro, culturas de referência e sequências obtidas no GenBank. Os primers ITS5/ITS4, LR5/LR0R, T1/T224 e Bt2a/Bt1b foram usados para amplificar e sequenciar as respectivas regiões. A partir dos agrupamentos resultantes gerados por ML e BI, assume-se a sinonímia de *S. microspora* com *S. globosa*, corrobora a combinação de *Memnoniella* para *Stachybotrys* e reavalia o status de *S. reniformis*. Comparadas com sequências de representantes de Dothideomycetes, as sequências do complexo *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces* formaram um grupo monofilético. Dentro do complexo foi possível estabelecer dois clados: um com sequências de *Speiropsis*, e outro com sequências de *Wiesneriomyces*, *Phalangispora* e *Pseudophragma*. Este resultado corrobora a sinonimização de *W. conjunctosporus*, *W. laurinus*, *Ph. nawawii* e *Ps. indicum*. Este estudo visou esclarecer as relações filogenéticas destes complexos. Os resultados ressaltam a necessidade de mais estudos filogenéticos envolvendo outros gêneros aparentados morfologicamente.

Palavras-chave: Hypocreales, Tubeufiales, Fungos conidiais.

ABSTRACT

Among the conidial fungi, the genera *Stachybotrys* Corda and *Memnoniella* Höhnelt are characterized by how the conidia are formed through the phialides of basipetal way. Although *Stachybotrys* and *Memnoniella* be considered distinct genera, demonstrating the willingness of conidia in long dry chains in *Memnoniella* and fused masses in *Stachybotrys*, it is considered that this difference alone does not influence to separate them, since molecular markers suggest that the provision of conidia in mucilage or chain are derived character states. In the other hand, the *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces* complex presents as common features the presence of conidia with conical and cylindrical shapes in chains connected by an isthmus and spore production of holoblastic type. *Phalangispora* and *Wiesneriomyces* have conidiophores organized into sporodochium with arrows, and branched and unbranched conidia, respectively. The *Speiropsis* species have simple conidiophores and conidia in branched chains or not. This study aimed to establish a phylogeny for *Stachybotrys-Memnoniella* and *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces* complexes using ITS, LSU, β -tubulin 1, β -tubulin 2 sequences of isolates of the Brazilian semiarid, reference cultures and sequences obtained from GenBank. The primers ITS5/ITS4, LR5/LR0R, T1/T224 and Bt2a/Bt1b were used to amplify and to sequence the respective regions. From the resulting clusters generated by ML and BI analysis, stores the synonyms of *S. microspora* with *S. globose*, corroborates the combination of *Memnoniella* to *Stachybotrys* and reevaluates the status of *S. reniformis*. After careful analysis was proposed combining *M. levispora* to *S. echinata* and others species of *Memnoniella* to *Stachybotrys*. Compared with sequences of representatives of Dothideomycetes, sequences of *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces* complex form a monophyletic group. Within the complex could be established two clades: one with sequences of *Speiropsis* and another one with sequences of *Wiesneriomyces*, *Phalangispora* and *Pseudophragma*. This result corroborates the synonymization of *W. conjunctosporus*, *W. laurinus*, *Ph. nawawii* and *Ps. indicum* This study aimed to clarify the phylogenetic relationships of this complex. The results underscore the need for more phylogenetic studies involving others genera related morphologically.

Key-words: Hypocreales, Tubeufiales, Conidial fungi.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – A - <i>PHALANGISPORA CONSTRICTA</i>, B - <i>SPEIROPSIS PEDATOSPORA</i>, C - <i>WIESNERIOMYCES LAURINUS</i>.	30
FIGURA 2 - <i>STACHYBOTRYS MICROSPORA</i> (A, B), <i>STACHYBOTRYS GLOBOSA</i> (C, D): CONIDIÓFOROS, CÉLULAS CONIDIOGÊNICAS E CONÍDIOS. BARRA = 10 MM.	33
FIGURA 3 - FILOGRAMA DO COMPLEXO <i>STACHYBOTRYS-MEMNONIELLA</i> GERADO A PARTIR DE ANÁLISE DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA DE MATRIZ COMBINADA COM OS MARCADORES ITS, LSU. B-TUB1 E B-TUB2. OS VALORES NOS CLADOS CORRESPONDEM AO SUPORTE DE BOOTSTRAP DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA E PROBABILIDADE POSTERIOR DA INFERÊNCIA BAYESIANA.	34
FIGURA 4 - FILOGRAMA DO COMPLEXO <i>STACHYBOTRYS-MEMNONIELLA</i> GERADO A PARTIR DE ANÁLISE DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA DE MATRIZ GERADA COM SE QUÊNCIAS DO MARCADOR ITS. OS VALORES NOS CLADOS CORRESPONDEM AO SUPORTE DE BOOTSTRAP DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA E PROBABILIDADE POSTERIOR DA INFERÊNCIA BAYESIANA.	35
FIGURA 5 - FILOGRAMA DO COMPLEXO <i>STACHYBOTRYS-MEMNONIELLA</i> GERADO A PARTIR DE ANÁLISE DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA DE MATRIZ GERADA COM SE QUÊNCIAS DO MARCADOR LSU. OS VALORES NOS CLADOS CORRESPONDEM AO SUPORTE DE BOOTSTRAP DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA E PROBABILIDADE POSTERIOR DA INFERÊNCIA BAYESIANA.	36
FIGURA 6 - FILOGRAMA DO COMPLEXO <i>STACHYBOTRYS-MEMNONIELLA</i> GERADO A PARTIR DE ANÁLISE DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA DE MATRIZ GERADA COM SE QUÊNCIAS DO MARCADOR B-TUB1. OS VALORES NOS CLADOS CORRESPONDEM AO SUPORTE DE BOOTSTRAP DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA E PROBABILIDADE POSTERIOR DA INFERÊNCIA BAYESIANA.	37
FIGURA 7 - FILOGRAMA DO COMPLEXO <i>STACHYBOTRYS-MEMNONIELLA</i> GERADO A PARTIR DE ANÁLISE DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA DE MATRIZ GERADA COM SE QUÊNCIAS DO MARCADOR B-TUB2. OS VALORES NOS CLADOS CORRESPONDEM AO SUPORTE DE BOOTSTRAP DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA E PROBABILIDADE POSTERIOR DA INFERÊNCIA BAYESIANA.	37
FIGURA 8 - FILOGRAMA DO COMPLEXO <i>PHALANGISPORA-SPEIROPSIS-WIESNERIOMYCES</i> GERADO A PARTIR DE ANÁLISE DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA DE MATRIZ COMBINADA COM OS MARCADORES ITS, LSU. B-TUBULINA 1 E B-TUBULINA 2. OS VALORES NOS CLADOS CORRESPONDEM AO SUPORTE DE BOOTSTRAP.	40

FIGURA 9 - FILOGRAMA DO COMPLEXO *PHALANGISPORA-SPEIROPSIS-WIESNERIOMYCES* GERADO A PARTIR DE ANÁLISE DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA, UTILIZANDO O MARCADOR ITS, COM REPRESENTANTES DA CLASSE DO THIDEOMYCETES. OS VALORES NOS CLADOS CORRESPONDEM AO SUPORTE DE BOOTSTRAP.41

FIGURA 10 - FILOGRAMA DO COMPLEXO *PHALANGISPORA-SPEIROPSIS-WIESNERIOMYCES* GERADO A PARTIR DE ANÁLISE DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA, UTILIZANDO O MARCADOR ITS-LSU, INCLUINDO SEQUÊNCIAS DE *W. CONJUNTOSPORUS*, UTILIZADAS POR SUETRONG ET AL. (2014). OS VALORES NOS CLADOS CORRESPONDEM AO SUPORTE DE BOOTSTRAP.....42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SEQUÊNCIAS DE ISOLADOS UTILIZADOS PARA INFERIR A FILOGENIA DE <i>STACHYBOTRYS</i> E <i>MEMNONIELLA</i>	17
TABELA 2 - SEQUÊNCIAS DE ISOLADOS UTILIZADOS PARA INFERIR A FILOGENIA DE <i>PHALANGISPORA</i> , <i>SPEIROPSIS</i> E <i>WIESNERIOMYCES</i>	20
TABELA 3 - NÚMEROS DE ESPÉCIMES FÚNGICOS, TOTAL DE CARACTERES E ESCORES DE VEROSSIMILHANÇA DA ML E BI EM CADA MATRIZ..	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	PROBLEMATIZAÇÃO	15
1.2	OBJETIVOS	16
1.2.1	Objetivo Geral	16
1.2.2	Objetivos Específicos	16
1.3	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEORICA	25
2.1	O REINO FUNGI	25
2.2	A CLASSIFICAÇÃO DO REINO FUNGI	25
2.3	OS FUNGOS CONIDIAIS OU ASCOMICETES ASSEXUAIS	26
2.4	O COMPLEXO <i>STACHYBOTRYS-MEMNONIELLA</i>	27
2.5	O COMPLEXO <i>PHALANGISPORA-SPEIROPSIS-WIESNERIOMYCES</i>	29
3	ANÁLISE DOS RESULTADOS	32
3.1	COMPLEXO <i>STACHYBOTRYS-MEMNONIELLA</i>	32
3.1	COMPLEXO <i>PHALANGISPORA-SPEIROPIS-WIESNERIOMYCES</i>	39
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS OU CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Introdução

Os fungos são reconhecidos como um grupo monofilético, caracterizados por uma nutrição heterotrófica absorptiva, com estruturas somáticas geralmente filamentosas e ramificadas, conhecidas como hifas, tipicamente envolvidas por parede celular (Alexopoulos *et al.* 1996), que produzem esporos de origem sexual ou assexual (Seifert 2009). Um estudo realizado por O'Brien *et al.* (2005), utilizando sequências retiradas de amostras ambientais para inferir a diversidade específica de fungos do solo, estabeleceu uma estimativa entre 3,5 e 5,1 milhões de espécies.

Os fungos conidiais, por sua vez, representam a fase assexual dos filos Ascomycota e Basidiomycota, e são caracterizados pela produção de conídios, que são esporos de origem mitótica (Kendrick 2001). Estão entre os fungos mais abundantes no solo, na serapilheira e em ambientes aquáticos e terrestres, desenvolvendo papéis como decompositores ou como patógenos em plantas e animais (Webster & Weber 2007).

Entre os Ascomycota assexuais, os gêneros *Stachybotrys* Corda (1837) e *Memnoniella* Höhnelt (1923) caracterizam-se pela conidiogênese fialídica, com conídios em cadeias ou não (Smith 1962). Apesar de *Stachybotrys* (69 espécies) e *Memnoniella* (cinco espécies) (Kirk *et al.* 2008, Wang *et al.* 2015) serem considerados gêneros distintos, a única diferença evidente é a disposição dos conídios, que em *Memnoniella* estão em longas cadeias e em *Stachybotrys* estão agrupados em massas mucilaginosas (Jong & Davis 1976). Segundo alguns autores, esta diferença por si só não exerce uma grande influência para separá-los (Smith 1962). Haugland *et al.* (2001), utilizando marcadores do DNA nuclear ribossômico, sugeriram que a disposição dos conídios em mucilagem ou em cadeia sejam estados de caráter derivados, resultantes de convergência evolutiva. Atualmente estes dois gêneros estão incluídos na ordem Hypocreales (Ascomycota).

O complexo *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces* agrega gêneros que compartilham a presença de conídios em cadeias conectados por um istmo e conidiogênese do tipo poliblastica.

O gênero *Phalangispora* Nawawi & Webster possui três espécies descritas (*P. bharathensis* T.S.K. Prasad & Bhat, *P. constricta* Nawawi & J. Webster e *P. nawawii*

Kuthub.) cujos conidióforos são organizados em esporodóquio, com setas, e conídios ramificados, constrictos e septados (Nawawi & Webster 1982, Kuthubutheen 1987, Keshava Prasad & Bhat 2002).

O gênero *Speiropsis* Tubaki (1958) é representado por nove espécies que possuem conidióforos simples, conídios em cadeias conectados por um istmo estreito. *Speiropsis* é considerado aquático e apresenta distribuição tropical e subtropical (Barbosa & Gusmão 2005). No entanto, representantes desse gênero são encontrados tanto sobre detritos submersos quanto terrestres.

O gênero *Wiesneriomyces* Koorders (1907) caracteriza-se pela presença de esporodóquios providos de setas com massa conidial agregada por mucilagem na parte central; células conidiogênicas poliblasticas, determinadas e conídios produzidos em cadeias. Apresenta distribuição cosmopolita (Kuthubutheen & Nawawi 1988), sendo encontrado em serapilheira (Kirk 1984). Atualmente duas espécies compõe o gênero (*W. laurinus* (Tassi) P.M. Kirk e *W. conjunctosporus* Kuthub. & Nawawi).

Entre *Phalangispora*, *Speiropsis* e *Wiesneriomyces*, as células conidiogênicas poliblasticas, as cadeias de conídios, com formas cônicas e cilíndricas são características comuns, diferindo apenas na forma do conidióforo, que pode ser livre ou em esporodóquio e na presença ou ausência de setas.

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Na taxonomia de fungos conidiais, as formas de suas estruturas de reprodução são indispensáveis na delimitação das espécies. Entretanto, infere-se que a morfologia apresentada pode ter sido produto de evolução convergente, obtidas a partir da exposição a pressões ambientais similares (Seena *et al.* 2010) ou plasticidade fenotípica expressada por um mesmo genótipo. Por isso, a identificação de espécies por meio de fragmentos de DNA traz um conjunto de dados satisfatório para suportar estudos sobre essa diversidade que os organismos oferecem e, portanto, proporciona maior precisão para a taxonomia (Seifert 2009).

A disparidade entre a diversidade estimada e a totalidade de espécies conhecidas no reino Fungi torna necessário o uso de técnicas mais flexíveis de identificação taxonômica. Partindo desse princípio, o DNA passou a ser visto como

ferramenta de eficiência acurada na resolução de problemas taxonômicos (Begerow *et al.* 2010).

Os atributos fenotípicos divergentes, tais como a forma do conidióforo e a presença-ausência de seta não são precisos o suficiente para separar *Phalangispora*, *Speiropsis* e *Wiesneriomyces*, assim como a organização dos conídios no complexo *Stachybotrys-Memnoniella*. Dessa forma, pretendeu-se estabelecer as relações filogenéticas para dois complexos: o complexo *Stachybotrys-Memnoniella* e o complexo *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Esse estudo objetivou estabelecer a filogenia dos complexos *Stachybotrys-Memnoniella* e *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces*, utilizando sequências das regiões ITS e LSU rDNA, β -tubulina 1 e β -tubulina 2 de isolados do Semiárido brasileiro, sequências obtidas no GenBank, bem como culturas de referência solicitadas as coleções X,Y,Z..

1.2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho correspondem às ações desenvolvidas para atingir o objetivo geral:

- a) Reativação de isolados fúngicos em culturas;
- b) Identificação morfológica dos espécimes por meio de literatura especializada;
- c) Gerar sequências das regiões ITS e LSU rDNA, β -tubulina 1 e β -tubulina 2, as quais serão utilizadas para confeccionar árvores filogenéticas e depositadas no GenBank.

1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Reativação de culturas e comparação morfológica

Os espécimes foram fornecidos pela Coleção de Cultura do Laboratório de Micologia (CCLAMIC) da Universidade Estadual de Feira de Santana, associada à

Coleção de Microrganismos da Bahia (CCMB), assim como sequências depositadas no GenBank, e espécimes de referência adquiridas em coleções de cultura internacionais (Tabelas 1 e 2).

Os espécimes em culturas foram reativados para observação das estruturas reprodutivas. Assim que esporularam, os espécimes foram observados à microscopia ótica e considerados para comparação morfológica. A descrição morfológica dos espécimes do complexo *Stachybotrys-Memnoniella* foi realizada com o auxílio da literatura especializada (Jong & Davis 1976, Pinruan *et al.* 2004, Santa Izabel *et al.* 2010).

Dos 14 representantes do complexo *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces*, oito possuem espécies em cultura - 17 espécimes de *Speiropsis*, 25 espécimes de *Wiesneriomyces* e um espécime de *Phalangispora* - depositados nas coleções dos Estados Unidos (ATCC), Holanda (CBS), Tailândia (BCC), Bélgica (MUCL) e Japão (JCM e NBRC), as quais foram adquiridas (Tabela 2).

Tabela 1. Sequências de isolados utilizados para inferir a filogenia de *Stachybotrys* e *Memnoniella* (Em negrito as sequências geradas no presente estudo).

Espécie	Cultura	País	ITS	LSU	βTUB1	βTUB2
<i>Fusarium oxysporum</i>	FOP-SP1					EF450110
<i>F. sambucinum</i>	CBS 146.95	United Kingdom	KM231813	KM231682	KM232078	
<i>Haematonectria haematococca</i>	GJS89-70			AY489729		
<i>Stachybotrys albipes</i>	ATCC 18873	United Kingdom	AF081478	AF081478		
<i>S. aloetica</i>	CBS 137940	South Africa	KJ817888	KJ817890	KJ817886	
<i>S. breviscula</i>	HGUP 0204	China	KC305320			
<i>S. chartarum</i>	UAMH 10151	Canada			AY095956	
<i>S. chartarum</i>	UAMH 10154	Canada	AY095974		AY095953	
<i>S. chartarum</i>	UAMH 10155	Canada	AY095976		AY095955	
<i>S. chartarum</i>	UAMH 6715	Canada			AY180249	
<i>S. chartarum</i>	ATCC 16026	United Kingdom			AY180251	
<i>S. chartarum</i>	ATCC 26303	Finland	AY185566	KC146372	AY180250	
<i>S. chartarum</i>	CBS 129.13				KM232127	
<i>S. chartarum</i>	FCUL 010407SP4	Portugal		JF746157		
<i>S. chartarum</i>	HGUP 0206	China	KC305318			

<i>S. chartarum</i>	HGUP 0889	China	KC305327		
<i>S. chartarum</i>	HGUP 0493	China	KC305332		
<i>S. chartarum</i>	HGUP 0494	China	KC305333		
<i>S. chartarum</i>	HGUP 0495	China	KC305334		
<i>S. chartarum</i>	HGUP 0499	China	KC305337		
<i>S. chartarum</i>	HGUP 0479	China	KC305347	KC305347	
<i>S. chartarum</i>	HGUP 0497	China	KC305356	KC305356	
<i>S. chartarum</i>	WGC-25C-6	China	KC787692	KC787691	
<i>S. chartarum</i>	DAOM 183927	Canada	JN942889	JN938871	
<i>S. chartarum</i>	LAMIC000107	Brazil	KF626502		
<i>S. chartarum</i>	LAMIC000111	Brazil	KF626507	KP893300	
<i>S. chartarum</i>	LAMIC001510	Brazil	KF626496	KP893324	
<i>S. chartarum</i>	LAMIC002211	Brazil	KF626508	KP893301	
<i>S. chartarum</i>	LAMIC003206	Brazil	KF626489		
<i>S. chartarum</i>	LAMIC003311	Brazil	KF626504		
<i>S. chartarum</i>	LAMIC004711	Brazil	KF626490		
<i>S. chartarum</i>	LAMIC007011	Brazil	KF626498	KT596059	
<i>S. chartarum</i>	LAMIC011608	Brazil	KF626499		
<i>S. chartarum</i>	LAMIC011708	Brazil	KF626500	KP893323	
<i>S. chartarum</i>	LAMIC015611	Brazil			KT354235
<i>S. chartarum</i>	LAMIC016211	Brazil	KF626509		
<i>S. chartarum</i>	LAMIC016411	Brazil	KF626501		
<i>S. chartarum</i>	LAMIC017111	Brazil	KF626503	KP893322	
<i>S. chlorohalonata</i>	UAMH 6417	Namibia	AF206273	AY489712	
<i>S. chlorohalonata</i>	UAMH 10156	Canada	AY095979		AY095958
<i>S. chlorohalonata</i>	UAMH 10152	Canada			AY095957
<i>S. chlorohalonata</i>	UAMH 10153	Germany	AY095980		AY095959
<i>S. chlorohalonata</i>	CBS 109285	Denmark	AY180261		AY180246
<i>S. chlorohalonata</i>	UAMH 3228	United States	AY180262		AY180247
<i>S. chlorohalonata</i>	DAOM 235557		JN942888	JN938870	
<i>S. chlorohalonata</i>	ATCC 9182	United States	AF081468	AF081468	AY180248
<i>S. chlorohalonata</i>	LAMIC001811	Brazil	KF626497	KP893325	KT354236
<i>S. chlorohalonata</i>	LAMIC006411	Brazil	KF626510	KP893306	KT336485
<i>S. chlorohalonata</i>	LAMIC007706	Brazil		KP893326	KT336486 KT354237
<i>S. chlorohalonata</i>	LAMIC011511	Brazil		KP893305	KT336484 KT354238
<i>S. dichroa</i>	ATCC 18913	United Kingdom	AF081472	AF081472	
<i>S. echinata</i>	NRRL 2181	Solomon Islands	AF205444		
<i>S. echinata</i>	NRRL 1694		AF205446		

<i>S. echinata</i>	JS6309	United States	AF205448			
<i>S. echinata</i>	ATCC 34173	United States	AF205451			
<i>S. echinata</i>	UAMH 6594	Canada	AF081470	AF081470		
<i>S. echinata</i>	DAOM 173162	Canada	JN942886	JN938868		
<i>S. echinata</i>	HGUP 0468	China	KC305358	KC305358		
<i>S. echinata</i>	LAMIC000211	Brazil	KF626506	KP893298		
<i>S. echinata</i>	LAMIC000407	Brazil	KF626494	KP893320		
<i>S. echinata</i>	LAMIC000910	Brazil	KP878515	KP893321	KT336481	
<i>S. echinata</i>	LAMIC001206	Brazil	KF626484	KP893299	KT336479	
<i>S. echinata</i>	LAMIC001307	Brazil	KF626485	KP893308	KT336478	KT354229
<i>S. echinata</i>	LAMIC008106	Brazil	KP878514	KP893311	KT336480	KT354232
<i>S. echinata</i>	LAMIC008208	Brazil	KF626493	KP893310	KT194211	KT354228
<i>S. elegans</i>	ATCC 22173	Germany	AF081480	AF081480		
<i>S. elegans</i>	ATCC 188825		DQ369856			
<i>S. elegans</i>	DAOM 225565		JN942885	JN938867		
<i>S. elegans</i>	PYL05-7	China	JX077033			
<i>S. elegans</i>	HGUP 0310	China	JX998164			
<i>S. elegans</i>	HGUP 0208	China	KC305352	KC305352		
<i>S. eucylindrospora</i>	ATCC 18851	Canada	AF081474	AF081474		
<i>S. eucylindrospora</i>	DAOM 186941	Canada	JN942887	JN938869		
<i>S. eucylindrospora</i>	HGUP 0179	China	KC305350	KC305350		
<i>S. globosa</i>	LAMIC001110	Brazil	KF626483	KP893316	KT336488	KT354230
<i>S. kampalensis</i>	ATCC 22705	New Guinea	AF081477	AF081477	AY180252	
<i>S. levispora</i>	LAMIC003308	Brazil	KF626495	KP893317	KT336483	KT354227
<i>S. levispora</i>	LAMIC012007	Brazil	KP878517	KP893313	KT336482	KT354231
<i>S. levispora</i>	LAMIC000407	Brazil	KF626494			
<i>S. longispora</i>	ATCC 32451	Japan	AF081482			
<i>S. longistipitata</i>	ATCC 22699	Japan	AF081471	AF081471		
<i>S. microspora</i>	ATCC 18852	Nigeria	AF081475	AF081475		
<i>S. microspora</i>	HGUP 0234	China	KC305285			
<i>S. microspora</i>	HGUP 0203	China	KC305349	KC305349		
<i>S. microspora</i>	LAMIC000606	Brazil	KF626482	KP893309		KT354233
<i>S. microspora</i>	LAMIC007806	Brazil	KP878518	KP893315	KT336487	KT354234
<i>S. nephrospora</i>	LAMIC001907	Brazil	KF626486			
<i>S. nephrospora</i>	LAMIC002207	Brazil	KF626488	KP893314		
<i>S. nephrospora</i>	LAMIC004007	Brazil	KP878513	KP893312		
<i>S. nephrospora</i>	LAMIC012307	Brazil	KF626492	KP893318		
<i>S. oenanthes</i>	ATCC 22844	United Kingdom	AF081473			

<i>S. oleronensis</i>	CIRM BRFM MH160412	France	KF777192		
<i>S. pallescens</i>	HGUP 0146	China	KC305345	KC305345	
<i>S. parvispora</i>	ATCC 18877	Greece	AF081483	AF081483	
<i>S. parvispora</i>	NRRL 54531	United States	JN093263	JN093263	
<i>S. parvispora</i>	LAMIC002106	Brazil			KP893319
<i>S. parvispora</i>	LAMIC006807	Brazil	KF626505		KP893307
<i>S. parvispora</i>	LAMIC009707	Brazil	KF626491		
<i>S. reniformis</i>	ATCC 18839	Japan	AF081476	AF081476	
<i>S. sansevieriae</i>	HGUP 0180	China	KC305267		
<i>S. sansevieriicola</i>	CBS 138872	Tanzania	KR476717	KR476752	KR476794
<i>S. subcylindrospora</i>	HGUP 0201	China	JX998163		
<i>S. subreniformis</i>	HGUP 1051	China	KC305348	KC305348	
<i>S. subsimplex</i>	ATCC 32888	United States	AF205439	AF205439	
<i>S. subsimplex</i>	ATCC 22700	New Guinea	AF205440		
<i>S. subsimplex</i>	ATCC 18838	Japan	AF205441		
<i>S. subsimplex</i>	ATCC 32334	Sri Lanka	AF205442		
<i>S. theobromae</i>	ATCC 18905	Malaysia	AF081479		
<i>S. yunnanensis</i>	HGUP 0745	China	KC305322		
<i>S. yunnanensis</i>	HGUP 0142	China	KC305246		
<i>S. yunnanensis</i>	HGUP 0144	China	KC305247		
<i>S. zaeae</i>	HGUP 0143	China	KC305308	KC305346	

Tabela 2. Sequências de isolados utilizados para inferir a filogenia de *Phalangispora*, *Speiropsis* e *Wiesneriomyces* (Em negrito as sequencias geradas no presente estudo).

Espécie	Cultura	País	ITS	LSU	Btub1	Btub2
<i>Aliquandostipite khaoyaiensis</i>	SS3321	Thailand	JN819278			
<i>Acanthostigma multiseptatum</i>	ANM 475	USA	GQ856145	GQ850492		
<i>Brachiosphaera tropicalis</i>	SS2522	Thailand	FJ887922			
<i>Cladosporium silenes</i>	CBS 109082	UK	EF679354	JF770463		
<i>Chaetosphaerulina lignicola</i>	MFLUCC 10-0121	Thailand	JN865205	JN865193		
<i>Dendryphiella arenaria</i>		Spain	HQ649989			
<i>Dothidea insculpta</i>	CBS189.58	France	AF027764			
<i>Helicoma chlamydosporum</i>	CBS 160.69	Italy	AY916466	AY856875		

<i>H. morganii</i>	CBS 281.54	USA	AY916468	AY856876		
<i>Helicoma vaccini</i>	CBS 216.90	USA	AY916486			
<i>Helicomycetes roseus</i>	CBS 283.51	Switzerland	AY916464	DQ678083		
<i>Helicosporium aureum</i>	NBRC 7098	Japan	AY916478	AY856894		
<i>H. guianense</i>	CBS 269.52		AY916487			
<i>H. linderi</i>	NBRC 9207	Panama	AY916454	AY856895		
<i>Jahnula appendiculata</i>	BCC 11400	Thailand	JN819280			
<i>J. australiensis</i>	SS3613	Thailand	FJ887915			
<i>Leptosphaeria maculans</i>		Canada	M96383			
<i>Mycosphaerella punctiformis</i>		Spain	FR668008			
<i>Neoacanthostigma filiforme</i>	ANM 514	USA	GQ856146	GQ850494		
<i>N. septoconstrictum</i>	ANM 536.1	USA	GQ856143	GQ850491		
<i>Neofusicoccum australe</i>	MUCC 492	Australia	EF591907			
<i>Phalangispora nawawii</i>	LAMIC041712	Brazil	KR822207	KR869798		
<i>Pseudogliophragma indicum</i>	MTCC 11985	India	KM052850	KM052851		
<i>Simonyella variegata</i>			DQ782835			
<i>Speiropsis pedatospora</i>	JCM 9864	Japan		KR869796		JCM 9864
<i>S. pedatospora</i>	CBS 397.59	Japan	KR822200	KR869797		
<i>S. pedatospora</i>	SS2229	Thailand	FJ887926			
<i>S. pedatospora</i>	SS2236	Thailand	FJ887927			
<i>S. scopiformis</i>	CBS 495.96	Cuba			CBS 495.96	CBS 495.96
<i>S. scopiformis</i>	LAMIC007206	Brazil	KR822201	KR869794		LAMIC007206
<i>S. scopiformis</i>	LAMIC002810	Brazil	KR822203		LAMIC002810	
<i>S. scopiformis</i>	LAMIC005111	Brazil	KR822206	KR869792	LAMIC005111	LAMIC005111
<i>S. scopiformis</i>	LAMIC010611	Brazil	KR822204	KR869795		
<i>S. scopiformis</i>	LAMIC004712	Brazil	KR822202	KR869793	LAMIC004712	LAMIC004712
<i>S. scopiformis</i>	LAMIC011112	Brazil	LAMIC011112		LAMIC011112	
<i>S. scopiformis</i>	LAMIC005013	Brazil	KR822205	KR869791	LAMIC005013	
<i>Teloschistes scorigenus</i>	SK3187	Spain	JN984135			
<i>Tetraploa aristata</i>	CBS 996.70	Japan	FJ887928			
<i>Thaxteriellopsis lignicola</i>	MFLUCC10-0124	Thailand	JN865208			
<i>Tubeufia cerea</i>	CBS 254.75	France		DQ470982		
<i>T. cerea</i>	CBS 941.72	Germany	AY916488			
<i>Wiesneriomyces conjunctosporus</i>	BCC4027	Thailand		KJ425449		
<i>W. conjunctosporus</i>	BCC 18525	Thailand		KJ425450		
<i>W. conjunctosporus</i>	BCC 18606	Thailand		KJ425451		

<i>W. conjunctosporus</i>	BCC 18608	Thailand		KJ425452		
<i>W. conjunctosporus</i>	BCC 20803	Thailand		KJ425453		
<i>W. conjunctosporus</i>	BCC 40615	Thailand		KJ425454		
<i>W. conjunctosporus</i>	BCC 40633	Thailand		KJ425455		
<i>W. laurinus</i>	BCC 18609	Thailand		KJ425459		
<i>W. laurinus</i>	BCC 40614	Thailand		KJ425460		
<i>W. laurinus</i>	BCC 2922	Thailand		KJ425456		
<i>W. laurinus</i>	BCC 40684	Thailand		KJ425461		
<i>W. laurinus</i>	BCC 3922	Thailand		KJ425457		
<i>W. laurinus</i>	DAOM 250029	Canada	KP057801	KP057802		
<i>W. laurinus</i>	CBS 101058	New Zealand	KR822217	KR869789	CBS 101058	CBS 101058
<i>W. laurinus</i>	CBS 101143	Venezuela	KR822215	KR869790		
<i>W. laurinus</i>	CBS 506.48	Indonesia	KR822212	KR869799		
<i>W. laurinus</i>	LAMIC006211	Brazil			LAMIC006211	
<i>W. laurinus</i>	LAMIC003112	Brazil		KR869801		
<i>W. laurinus</i>	LAMIC004712	Brazil		LAMIC004712		
<i>W. laurinus</i>	LAMIC012912	Brazil		KR869800		LAMIC012912
<i>W. laurinus</i>	LAMIC028512	Brazil	KR822213	KR869802		LAMIC028512
<i>W. laurinus</i>	LAMIC028912	Brazil	KR822208	KR869805		LAMIC028912
<i>W. laurinus</i>	LAMIC033512	Brazil	KR822210		LAMIC033512	
<i>W. laurinus</i>	LAMIC036112	Brazil	KR822209	KR869804	LAMIC036112	LAMIC036112
<i>W. laurinus</i>	LAMIC041312	Brazil			LAMIC041312	LAMIC041312
<i>W. laurinus</i>	LAMIC042812	Brazil	KR822211			
<i>W. laurinus</i>	MUCL 41042	Venezuela	KR822216	KR869803	MUCL 41042	MUCL 41042
<i>W. laurinus</i>	MUCL 41162	Brazil	KR822214			
<i>Xylomyces chlamydosporus</i>	SS0807	Thailand	FJ887918			

Os espécimes em foram reativados em caldo de extrato de Malte a 2%. Para extração de DNA foi utilizado DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden), seguindo as especificações do fabricante. Os primers ITS5/ITS4 White *et al.* (1990), LR5/LR0R (Vilgalys 2015), T1/T224 e Bt2a/Bt1b (Glass & Donaldson 1995, O'Donnell & Cigelnik 1997) foram utilizados para amplificar ITS, LSU, β -tubulin 1 (β TUB1) e β -tubulin 2 (β TUB2), respectivamente. A reação de PCR foi realizada com o volume final de 15 μ l, using 1,3 μ l H₂O ultrapura, 0,2 μ l de cada primer (15 pmol), 3 μ l de TBT-PAR, 0,3 μ l de DMSO, 9 μ l de TopTaq Master Mix (Qiagen, Hilden) e 1 μ l de DNA total (diluído 1:10). A reação foi efetuada no 9700 Geneamp Thermocycler (Applied Biosystems[®]), de acordo com as seguintes condições: pré-denaturação a 94°C por 1 min., 35 ciclos

incluindo denaturação a 94°C por 1 min., anelamento a 55°C por 1 min., e extensão a 72°C por 3 min., e extensão final a 72°C por 3 min., estocando a 4°C.

Ao término da reação, 1 µL de cada amostra amplificada mais 3 µL de Azul de Bromofenol foi observada através de eletroforese em gel de agarose (1%) com solução de brometo de etídio, e em seguida purificados com solução PEG (*Polyethylene Glycol*), como segue o protocolo adaptado de Lis & Schleif (1975).

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados diretamente. Os mesmos iniciadores utilizados para amplificação foram também utilizados como iniciadores nas reações de sequenciamento, alterando-se a concentração de 15 para 3 pmol. Os amplicons purificados foram marcados com o Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems®) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a reação de sequenciamento, os produtos da reação foram purificados. As sequências foram obtidas através da eletroforese capilar em sequenciador automático ABI PRISM 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Foram efetuadas, no mínimo, duas repetições de cada fragmento, em ambos os sentidos (direto e reverso).

Alinhamento de sequências e análises filogenéticas

As sequências foram então editadas no Staden Package (Staden 1996) gerando uma sequência-consenso a partir de um par de sequências direta e reversa. Posteriormente, as sequências-consenso foram analisados no BLAST. Também foi utilizada a ferramenta de alinhamento rápido da International Mycology Association (<http://www.mycobank.org/>). As sequências-consenso foram comparadas com as sequências do banco de nucleotídeos do GenBank e outras bases de dados de sequências de fungos, obtendo a identificação por máxima cobertura e máxima identidade.

Para comparar as sequências obtidas, sequências de *Stachybotrys* e demais representantes da ordem Hypocreales foram recuperadas do GenBank (Tabela 1). O alinhamento automático foi executado no programa Muscle v3.7 (Edgar, 2004), utilizando-se a configuração padrão. A edição do alinhamento foi efetuada no programa Mesquite v2.75 (Maddison & Maddison, 2011).

Análises de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) foram efetuadas no CIPRES Science Gateway v. 3.3 (Miller *et al.* 2010). O modelo de substituição selecionado foi GTRGAMMA e os parâmetros foram estimados no programa RaxML v.8 (Stamatakis 2014) durante a análise ML. A análise de bootstrap (BP) foi realizada com 1.000 replicatas e a árvore inicial foi escolhida aleatoriamente. A análise BI foi realizada no MrBayes v.3.2.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) com duas análises independentes de duas corridas paralelas e quatro cadeias, produzidas em 15.000.000 de gerações. Os primeiros 25% de árvores resultantes foram eliminadas como burn-in. A árvore consenso e as probabilidades posteriores foram calculadas no Paup (Swofford, 2002), combinando os resultados de ambas corridas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

2.1. O REINO FUNGI

Os fungos são seres eucarióticos, uni ou multinucleados, com talos homo ou heterocarióticos, haploides, dicarióticos ou diploides, sendo este último estágio geralmente de curta duração (Webster & Weber 2007). Representantes do Reino Fungi geralmente possuem o corpo constituído por uma parte somática, voltada para o desenvolvimento e absorção dos nutrientes, e uma parte reprodutiva, relacionada à produção e propagação de esporos (Silveira 1995). O Reino Fungi compreende organismos que em geral possuem hifas com parede celular composta de quitina, apresentam o glicogênio como substância de reserva energética e são exclusivamente heterótrofos absorptivos (Alexopoulos *et al.* 1996).

Os fungos possuem grande importância ecológica e econômica, pois são importantes decompositores em todos os ecossistemas, constituem a imensa maioria de fitopatógenos, causando um grande impacto econômico, oferecem sistemas genéticos bastante explorados pela biologia molecular e são cruciais na fermentação e na indústria biotecnológica (Webster & Weber 2007).

A estimativa para o número de espécies fúngicas foi estabelecida calibrando-se o número de espécies de fungos descritos com o número de espécies de plantas do Reino Unido, alcançando uma média de 6:1; desta forma, se o número de espécies de plantas descritas no mundo era 260 mil na época, a estimativa do número de fungos seria em torno de 1-1,5 milhão de espécies (Hawksworth 2001). Contudo, este cálculo não considerava os métodos moleculares como meios para a descoberta de novas espécies, a imensa diversidade nos trópicos e a associação dos fungos com outros organismos, como os invertebrados. Portanto, um estudo realizado por O'Brien *et al.* (2005), utilizando sequências retiradas de amostras ambientais para inferir a diversidade específica de fungos do solo, estabeleceu uma estimativa entre 3,5 e 5,1 milhões de espécies.

2.2. A CLASSIFICAÇÃO DO REINO FUNGI

Filogenias construídas a partir de sequências DNA e aminoácidos mostram que os fungos estão mais relacionados com os animais do que com as plantas

(Sugiyama 1998, Ebersberger *et al.* 2012). A classificação do Reino Fungi atualmente compreende nove filos bem suportados filogeneticamente: Ascomycota e Basidiomycota (Sub-reino Dikarya), Glomeromycota, Entomophthoromycota, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Cryptomycota e Microsporidia (Hibbett *et al.* 2007, Jones *et al.* 2011, Humber 2012). Muitos subfilos, cujas posições no Reino Fungi não foram bem estabelecidas, incluem Mucoromycotina, Kickxellomycotina e Zoopagomycotina (Hibbett *et al.* 2007).

O sub-reino Dikarya inclui fungos unicelulares ou filamentosos e sem flagelos. Durante a reprodução sexuada, a fusão dos gametas não é seguida diretamente da fusão nuclear, formando um dicário, constituindo uma parte importante do ciclo de vida nos Ascomycota e Basidiomycota (Stajich *et al.* 2009). Estes filos compreendem cerca de 98% dos fungos descritos e estudos filogenéticos sugerem o monofiletismo destes grupos (Sugiyama 1998, Stajich *et al.* 2009).

2.3. OS FUNGOS CONIDIAIS OU ASCOMICETES ASSEXUAIS

De acordo com Cannon & Kirk (2000), os fungos podem apresentar diferentes fases: a sexual e a assexual. A forma sexuada inclui a produção de esporos meióticos, também conhecida como teleomorfa. Já a fase assexuada ou anamorfa é caracterizada pela reprodução através de esporos mitospóricos. Existem ainda espécies cujas fases anamorfa e teleomorfa foram conectadas, designando-se holomorfos.

Os fungos conidiais representam a fase assexual dos filos Ascomycota e Basidiomycota, e são caracterizados pela reprodução de esporos através da mitose, que são denominados de conídios. Esses fungos possuem micélio septado, bem desenvolvido, reproduzindo-se por meio de conídios produzidos sobre ramificações especializadas do micélio ou no interior dos corpos de frutificação (Webster & Weber 2007).

Os conídios são bastante diversos na forma, estrutura e modos de dispersão. Podem dispor-se isoladamente ou em cadeia. São produzidos em células específicas, designadas células conidiogênicas, as quais podem ou não ser sustentadas por uma hifa especializada e fértil, denominada de conidióforo (Silveira

1995, Webster & Weber 2007).

As estruturas reprodutivas sexuais e assexuais proporcionam importantes características fenotípicas para diagnosticar as semelhanças filogenéticas entre os fungos. Contudo, quando eles perdem essas estruturas a identificação morfológica torna-se inviável. As comparações de sequências de DNA são uma ferramenta auxiliar ou alternativa para solucionar essa questão. Além disso, infere-se que as formas apresentadas podem ter sido produto de evolução convergente, obtidas a partir da exposição a pressões ambientais similares (Seena *et al.* 2010), ou plasticidade fenotípica expressada por um mesmo genótipo. Por isso, a identificação de espécies por meio de fragmentos específicos do DNA fornece um conjunto de dados aceitável para suportar estudos sobre essa diversidade que os organismos oferecem e, portanto proporciona maior precisão para a taxonomia.

2.4. O COMPLEXO *STACHYBOTRYS-MEMNONIELLA*

Stachybotrys foi descrito tendo como espécie tipo *S. atra* Corda (1837), com as seguintes características: Colônias aveludadas, hialinas no começo, posteriormente escuras e cintilantes devido à produção de conídios. Micélio principalmente imerso no substrato. Conidióforos macronematosos, mononematosos, eretos, simples, raramente ramificados perto da base, lisos e hialinos no começo, mas brevemente se tornam rugosos, especialmente em direção ao ápice, e oliváceos castanhos ou negros. Células conidiogênicas apicais, discretas, formando uma cabeça mais ou menos compacta, clavada a obovoide. Conídios originam-se em gotículas, amplamente elipsoides, algumas vezes subglobosos, castanho-escuros a negros, verrucosos.

A etimologia de *Stachybotrys* refere-se à coroa de fiálides características, com o prefixo grego *stachy-* referindo-se a uma “espiga”, e *-botrys* significando um “cacho de uvas” (Selke 2007).

Memnoniella Höhnel (1923) foi descrito para incluir aqueles fungos que possuem os conidióforos com um agrupamento apical de várias fiálides inchadas assemelhando-se àquelas de *Stachybotrys*, diferindo deste por ter esporos catenulados. Galloway (1933) coletou um fungo em fios de algodão e identificou-o como *Penicillium echinatum* Riv., que havia sido combinado como *Haplographium echinatum* (Riv.) Sacc.; no entanto, percebendo que era idêntico à *Memnoniella*

aterrima Höhn., combinou-o para *Memnoniella echinata* (Riv.) Galloway. De acordo com Kirk (1991) as características de *Memnoniella echinata* são: Colônias aveludadas, hialinas no início, depois preto e brilhante, devido à produção de conídios. Micélio imerso principalmente no substrato. Conidióforos macronematosos, mononematosos, eretos, simples, raramente ramificados perto da base, liso e hialino no início, muitas vezes tornando-se rugoso, especialmente em direção ao ápice, e oliváceos marrom ou preto. Células conidiogênicas apicais, discretas, formando uma cabeça mais ou menos compacto, clavadas a obovóides. Conídios apresentam-se em longas cadeias não ramificadas, globosos a esféricos achatados nos polos, castanho-escuros a negros, verrucosos.

Bisby (1943) propôs a sinonimização de *Memnoniella* e *Stachybotrys* por considerar que *Memnoniella echinata* havia sido confundida com *Stachybotrys subsimplex* Cooke. Zuck (1946) observou a tendência de *S. subsimplex* produzir tanto conídios em mucilagem quanto em cadeia, dependendo das condições ambientais. No entanto, Deighton (1960) reconheceu a separação dos gêneros com base nos conídios secos em cadeias, característicos em *Memnoniella*, e e combinou *S. subsimplex* para *Memnoniella subsimplex* (Cooke) Deighton. Já Smith (1962) combinou *Stachybotrys echinata* (Rivolta) G. Sm., propondo a sinonimização de ambos os gêneros, por considerar que a disposição dos esporos não era significativa para separá-los, assim como por possuírem conidiogênese idêntica. Demais autores, tais como Carmichael *et al.* (1980) e Pinruan *et al.* (2004), se colocaram pela sinonimização de ambos os gêneros em questão.

A principal característica em comum de *Stachybotrys* e *Memnoniella* é a produção de conidióforos macronematosos com um grupo apical de várias fiálides originando conídios enteroblásticos-fialídicos unicelulares. Assim como Jong & Davis (1976), outros autores também concordam com a separação (Padwick 1945, Deighton 1960, Matsushima 1971a, 1971b, 1975, Ellis 1971).

A forma, tamanho, cor e superfície ornamentada dos conídios são características usadas principalmente para distinguir as espécies de *Stachybotrys* e *Memnoniella* (Jong & Davis 1976).

Pela primeira vez, Haugland *et al.* (1998) obtiveram por filogenia o resultado de espécies de *Memnoniella* dentro do clado *Stachybotrys* com suporte de 95% de bootstrap da Máxima Parcimônia. Sobre o contraste entre cadeias secas e massas mucilaginosas de esporos, foi considerado não suficiente para separar esses dois

gêneros; as características morfológicas que são usadas para distinguir *Memnoniella* como um gênero separado sugerem estados de caracteres derivados que se desenvolveram em dois clados terminais diferentes (*S. echinata* e *S. subsimplex*) (Haugland *et al.* 2001). Os estudos moleculares subsequentes corroboram esta hipótese, confirmando que *Memnoniella* é parafilético para *Stachybotrys* (Castlebury *et al.* 2004, Koster *et al.* 2009, Jie *et al.* 2013).

Stachybotriaceae (Hypocreales, Sordariomycetes) foi proposta por Crous *et al.* (2015), seguido por uma revisão taxonômica e filogenética sobre *Stachybotrys* (Wang *et al.* 2015), que culminou na sinonimização dos dois gêneros. Wang *et al.* (2015) realizou uma revisão geral que compreendeu informações sobre a sua importância para a humanidade, tais como efeitos na saúde, potencial de patógenos humanos e animais, ambientes internos, controle biológico e também para a descoberta de novos compostos, bem como apresentaram um grande estudo filogenético incluindo 134 *Stachybotrys* spp. utilizando ITS, LSU, EF1- α e RPB2, analisados por máxima parcimônia (MP). Para sequências ITS eles obtiveram um grande clado incluindo sete espécies-grupos (Chartarum, Dichroa, Elegans, Echinata, Microspora, Parvispora e Subsimplex). Para LSU, o filograma foi utilizado para avaliar a posição genética de *Stachybotrys* em Hypocreales. Segundo os autores, os genes EF1-a e RPB2 dispõem de caracteres mais informativos para MP que o ITS.

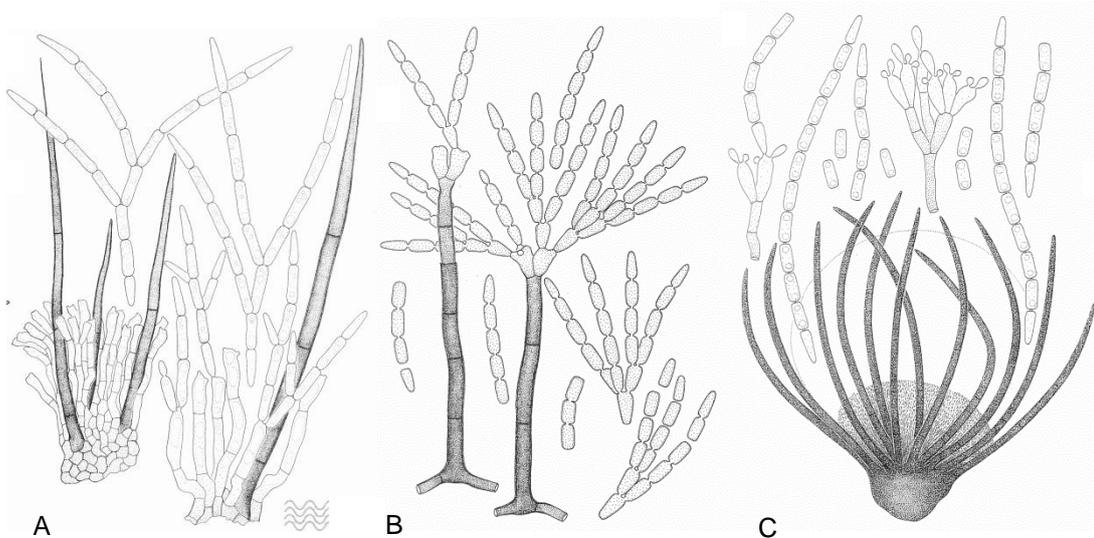
2.5. O COMPLEXO *PHALANGISPORASPEIROPSISWIESNERIOMYCES*

A classe Dothideomycetes é uma classe bastante heterogênea, agregando fungos que perduram na serapilheira, restos vegetais submersos, assim como patógenos de animais e plantas, sendo os membros mais conhecidos desse grupo fitopatógenos importantes na agricultura e silvicultura (Schoch *et al.* 2009). A reconstrução ancestral de modos de nutrição básica suportam numerosas transições de histórias de vida sapróbias para modos de associações com plantas e liquenizados e uma transição de habitat terrestre para aquático (Schoch *et al.* 2009).

Dentre os gêneros de hifomicetes dematiáceos que produzem conídios holoblásticos unicelulares conectados por um istmo que apresentam ou não cadeias ramificadas, destacam-se *Phalangispora* Nawawi & J. Webster, *Speiroopsis* Tubaki e *Wiesneriomyces* Koord. *Phalangispora* pode apresentar-se como

esporodóquio ou sinêmio curto setoso com crescimento determinado, produzindo conídios ramificados os quais são encontrados frequentemente em espumas e isolados de substratos submersos, demonstrando sua habilidade de sobreviver em ambiente aquático (Nawawi & Webster 1982, Kuthubutheen 1987, Keshava Prasad & Bhat 2002). *Speiropsis* é mononematoso, apresentando conídios em cadeias ramificadas ou não, e frequentemente encontrado na serapilheira e também em substrato submerso em água doce (Tubaki 1958, Barbosa & Gusmão 2005). *Wiesneriomyces*, produzindo conídios em cadeias não ramificadas e em esporodóquio setoso tem sido encontrado frequentemente sobre a serapilheira de muitas partes do mundo (Koorders 1907, Kirk 1984, Kuthubutheen & Nawawi 1988).

Figura 1. A - *Phalangispora constricta*, B - *Speiropsis pedatospora*, C - *Wiesneriomyces laurinus*.



Fonte: Seifert *et al.* (2011).

Phalangispora é composto por três espécies *P. constricta* Nawawi & J. Webster, *P. nawawii* Kuthub. e *P. bharathensis* T.S.K. Prasad & Bhat, que produzem conídios castanho-claros em cadeias ramificadas de esporodóquio setoso. O fungo tem sido relatado de substrato submerso (Kuthubutheen, 1987).

O gênero *Speiropsis* é caracterizado pelo conídio simples conectado por um istmo estreito se desenvolvendo em cadeias ramificadas ou não sobre conidióforos com células conidiogênicas discretas poliblasticas (Tubaki 1958). Em *S. aquatica* Aramb., *S. balauensis* Matsush., *S. ixorae* Subram., *S. scopiformis* Kuthub. e *S.*

simplex Matsush. conídios são produzidos em cadeias não ramificadas, enquanto em *S. hyalospora* Subram. & Lodha, *S. irregulares* R.H. Petersen, e *S. pedatospora* Tubaki os conídios estão em cadeias ramificadas. *Speiropsis rogergoosensis* T.S.K. Prasad & Bhat tem conídios catenados desenvolvidos em cadeias ramificadas divergentes (Keshava Prasad & Bhat, 2002).

Wiesneriomyces foi proposto por Koorders (1907) com *W. javanicus* como espécie tipo, tendo atualmente duas espécies *W. laurinus* (Tassi) Kirk e *W. conjunctosporus* Kuthub. & Nawawi. Kirk (1984) examinou o holótipo *Volutellaria laurina* Tassi e verificou que este proporcionava um nome precedente para *W. javanicus* e propôs a combinação *Wiesneriomyces laurinus* (Tassi) P. M. Kirk., com os seguintes sinônimos: *Volutellaria laurina*, *Chaetopeltis laurina* (Tassi) Sacc., *Tassia laurina* (Tassi) H. & P. Sydow e *Wiesneriomyces javanicus* Koord. O fungo é evidentemente cosmopolita e foi relatado de muitas partes do mundo incluindo Indonésia (Koorders, 1907), Índia (Subramanian 1956), Panamá (Manotis & Strain 1968), Papua-Nova Guiné (Matsushima 1971a), Japão (Matsushima 1975), Taiwan (Matsushima 1980), Reino Unido (Kirk 1983), Austrália (Shaw & Sutton 1985) e Brasil (Grandi & Gusmão 1997).

Wiesneriomyces conjunctosporus difere de *W. laurinus* em alguns aspectos. Geralmente as setas de *W. laurinus* são encurvados em volta da massa conidial enquanto em *W. conjunctosporus* as setas são eretas (Kuthubutheen & Nawawi 1988). A massa conidial de *W. laurinus* é geralmente em forma de taça com um plano superior e amarelada, castanho amarelado, amarelo dourado a oliváceo (Kirk 1984). A massa conidial de *W. conjunctosporus* é vastamente cônica com um topo arredondado e é levemente enrolado, invariavelmente branca e algumas vezes tingida de castanho com laranja (Kuthubutheen & Nawawi 1988).

Suetrong *et al.* (2014) propuseram a família Wiesneriomycetaceae, localizando representantes das duas espécies do gênero *Wiesneriomyces* como grupo-irmão de Tubeufiales (Dothideomycetes). Posteriormente, o gênero monotípico *Pseudogliophragma* Phadke & V.G. Rao foi incluído em Wiesneriomycetaceae, como grupo irmão de *W. laurinus* e *W. conjunctosporus* (Pratibha *et al.* 2014).

3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.1. COMPLEXO *STACHYBOTRYS-MEMNONIELLA*

Foi amostrado 29 espécies das 72 espécies do gênero *Stachybotrys* atualmente aceitas (Tabela 1), representado por 112 espécimes. Um total de 2,67% foi usado como grupo externo, e 97,33% são de *Stachybotrys* spp., com 33,92% referentes a sequências geradas neste estudo (Tabela 3). Um total de cinco filogramas foram gerados: i) conjunto de dados combinados para todos os quatro marcadores (Fig 3), ii) ITS (Fig 4), iii) LSU (Fig 5), iv) β TUB1 (Fig 6), v) β TUB2 (Fig 7). Os dados referentes ao número de espécimes fúngicos, ao total de caracteres e ao escore verossimilhança em cada matriz são apresentados na Tabela 3. Todos os clados foram nomeados de acordo com o táxon mais antigo.

Table 3. Números de espécimes fúngicos, total de caracteres e escores de verossimilhança da ML e BI em cada matriz.

Dados da matriz	ITS	LSU	β TUB1	β TUB2	Dados combinados
Número de espécimes	99 (34)*	60 (29)*	28 (12)*	16 (12)*	110
Total de caracteres	607	867	853	1302	3631
Verossimilhança ML	-3907.49	-2459.27	-4229.98	-4028.62	-14508.54
Verossimilhança BI	-3925.35	-2531.40	-4226.50	-4068.14	-15053.83

*Número de novas sequências introduzidas neste trabalho.

Entre as novidades na filogenia, duas espécies se apresentam como coespecíficas, *S. globosa* e *S. Microspora* (Figuras 3, 4, 6, 7). Esta hipótese é corroborada pelo fato de ambas apresentarem conídios esféricos e globosos (Jong & Davis 1976, Misra & Srivastava 1982). As diferenças no padrão de ramificação do conidióforo e a variação no tamanho dos conídios podem ter sido originadas a partir da plasticidade fenotípica. As espécies com conídios globosos são diferenciadas apenas pelo diâmetro dos conídios e pelo padrão de ramificação dos conidióforos (Pinruan *et al.*, 2004). Além disso, as características diagnósticas propostas para *S. microspora* e *S. globosa* se sobrepõe. Wang *et al.* (2015) em sua revisão, corrobora com a presente proposta, no entanto, na filogenia apresentada, não havia isolados de *S. globosa*.

Taxonomia

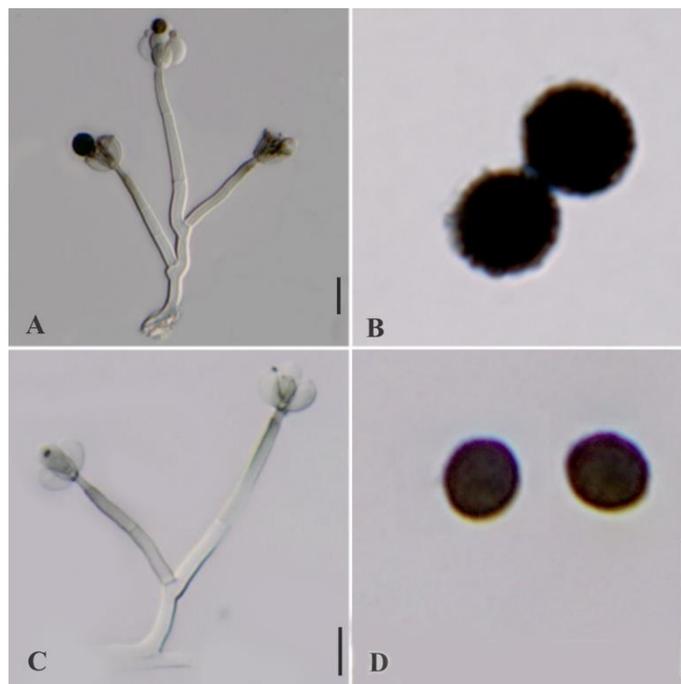
Stachybotrys microspora (B.L. Mathur & Sankhla) S.C. Jong & E.E. Davis,
Mycotaxon 3(3): 448 (1976)

≡ *Stachybotrys atra* var. *microspora* B.L. Mathur & Sankhla, *Sci. Cult.* 32(2): 93
(1966)

= *Stachybotrys globosa* P.C. Misra & S.K. Srivast., *Trans. Br. mycol. Soc.* 78(3): 556
(1982)

Conidióforos eretos, simples e ramificados, septados, lisos, 45-70 x 5 µm; células conidiogênicas monofialídicas, terminais, discretas, agrupadas no ápice dos conidióforos determinados, lisas, 15-18 x 4-10 µm; conídios globosos a subglobosos, agregados em mucilagem, verrucosos, negros, 4,5-13 µm (Figura 2).

Figura 2. *Stachybotrys microspora* (A, B), *Stachybotrys globosa* (C, D): conidióforos, células conidiogênicas e conídios. Barra = 10 µm.



Espécimes examinados: BRASIL. Rio Grande do Norte: Seridó. Sobre folhas em decomposição, SM Leão-Ferreira (cultura LAMIC 0006/06). BRASIL. Bahia: Souza. Sobre folhas em decomposiçã, L.A. Costa (cultura LAMIC 0011/10).

Figura 4. Filograma do complexo *Stachybotrys-Memnoniella* gerado a partir de análise de Máxima Verossimilhança de matriz gerada com se quências do marcador ITS. Os valores nos cladogramas correspondem ao suporte de bootstrap da Máxima Verossimilhança e probabilidade posterior da Inferência Bayesiana.

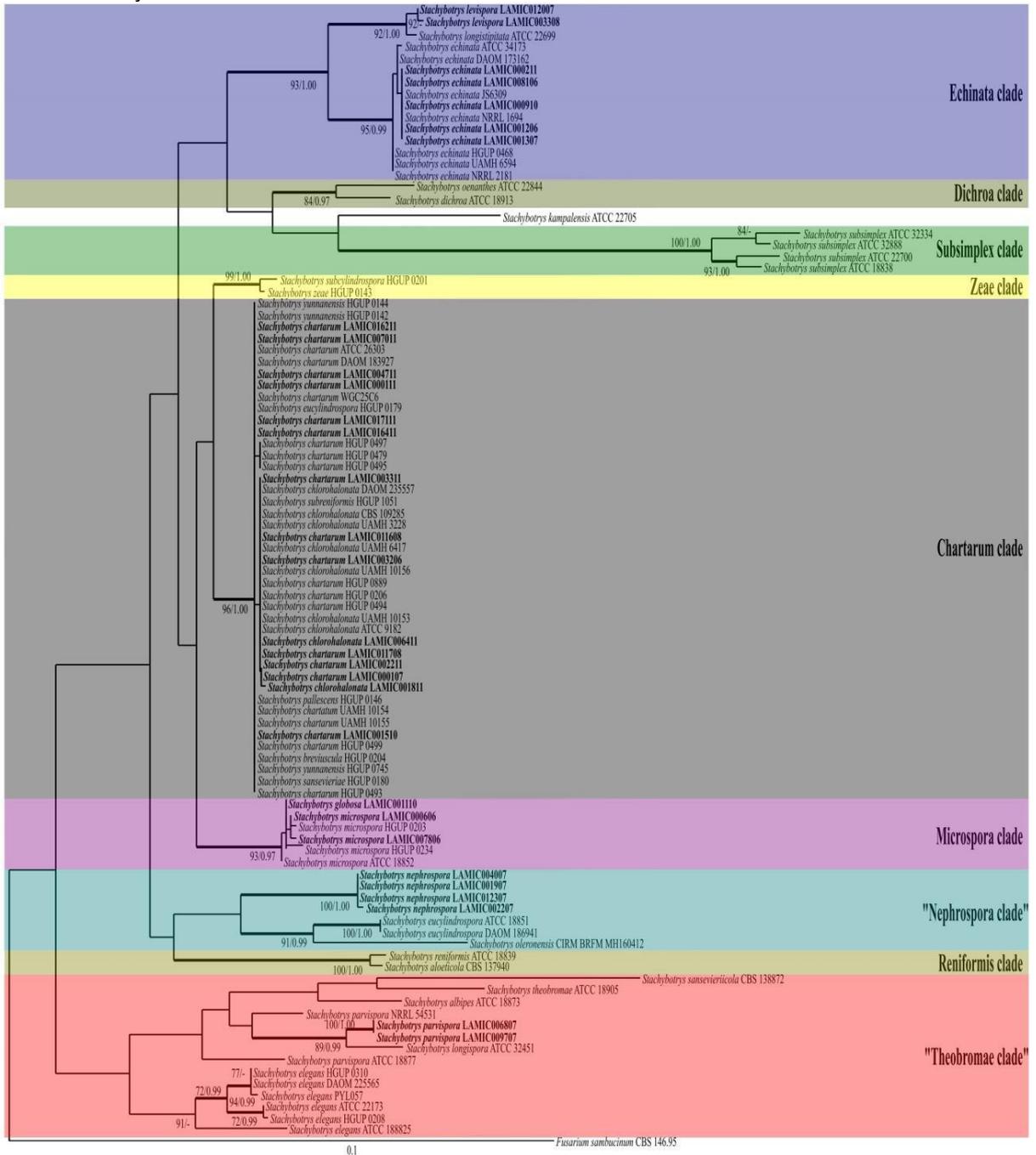


Figura 5. Filograma do complexo *Stachybotrys-Memnoniella* gerado a partir de análise de Máxima Verossimilhança de matriz gerada com se quências do marcador LSU. Os valores nos cladogramas correspondem ao suporte de bootstrap da Máxima Verossimilhança e probabilidade posterior da Inferência Bayesiana.

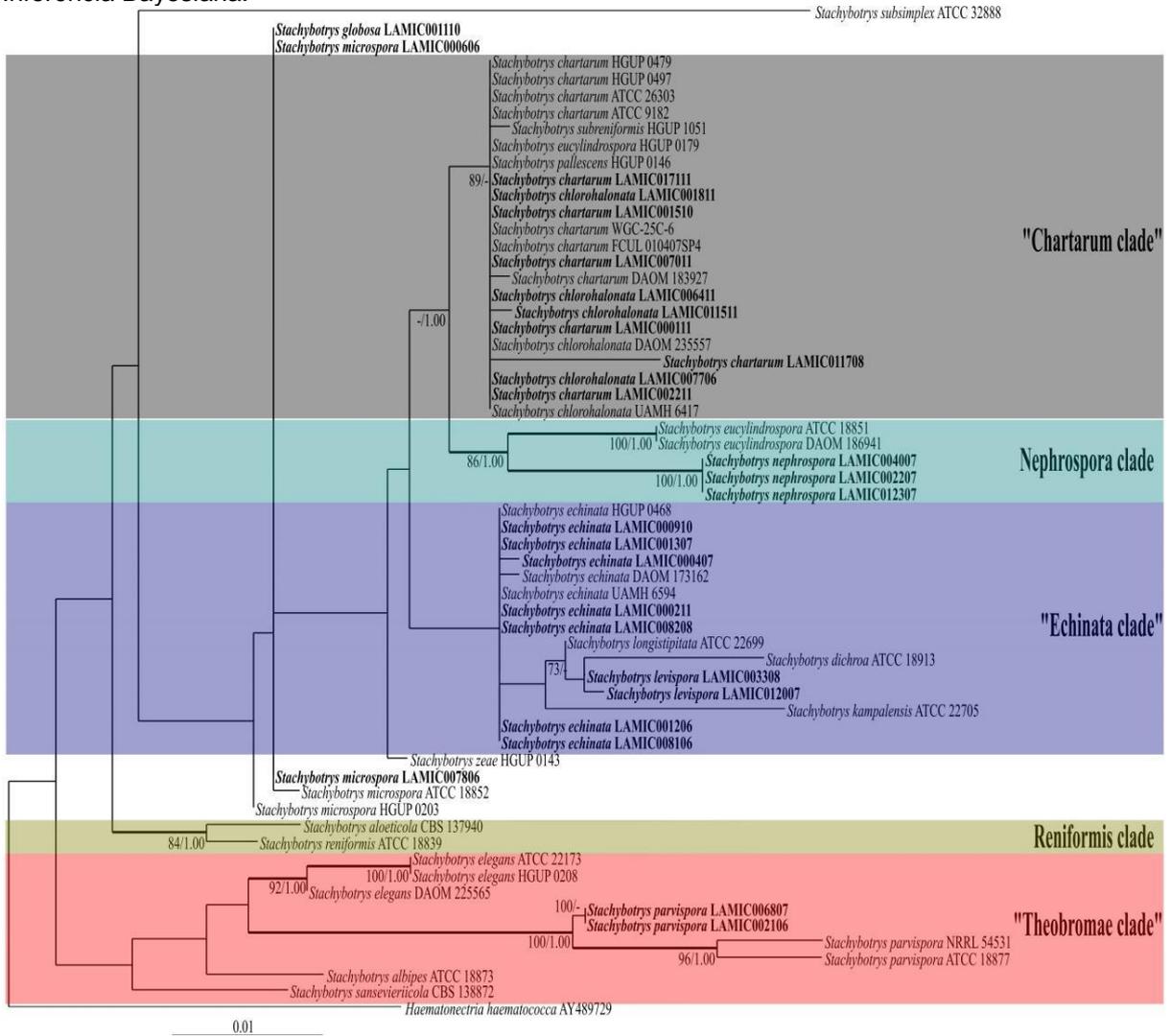


Figura 6. Filograma do complexo *Stachybotrys-Memnoniella* gerado a partir de análise de Máxima Verossimilhança de matriz gerada com se quências do marcador β -TUB1. Os valores nos cladogramas correspondem ao suporte de bootstrap da Máxima Verossimilhança e probabilidade posterior da Inferência Bayesiana.

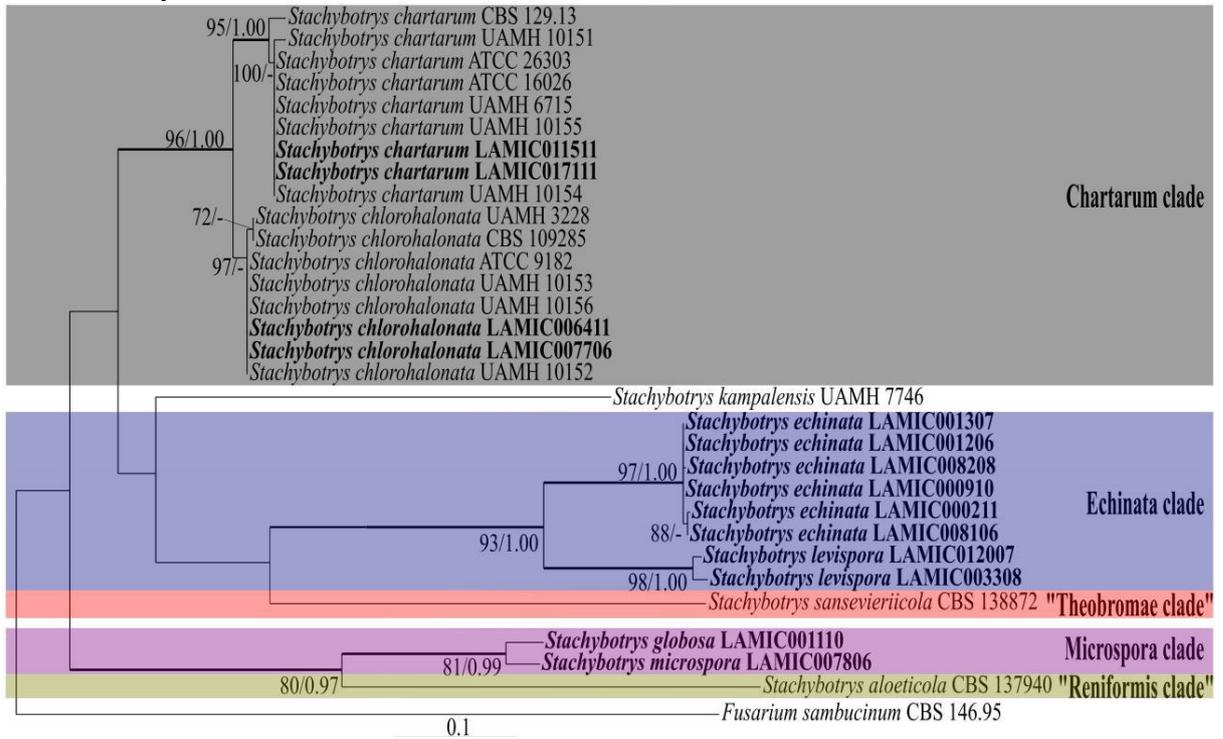
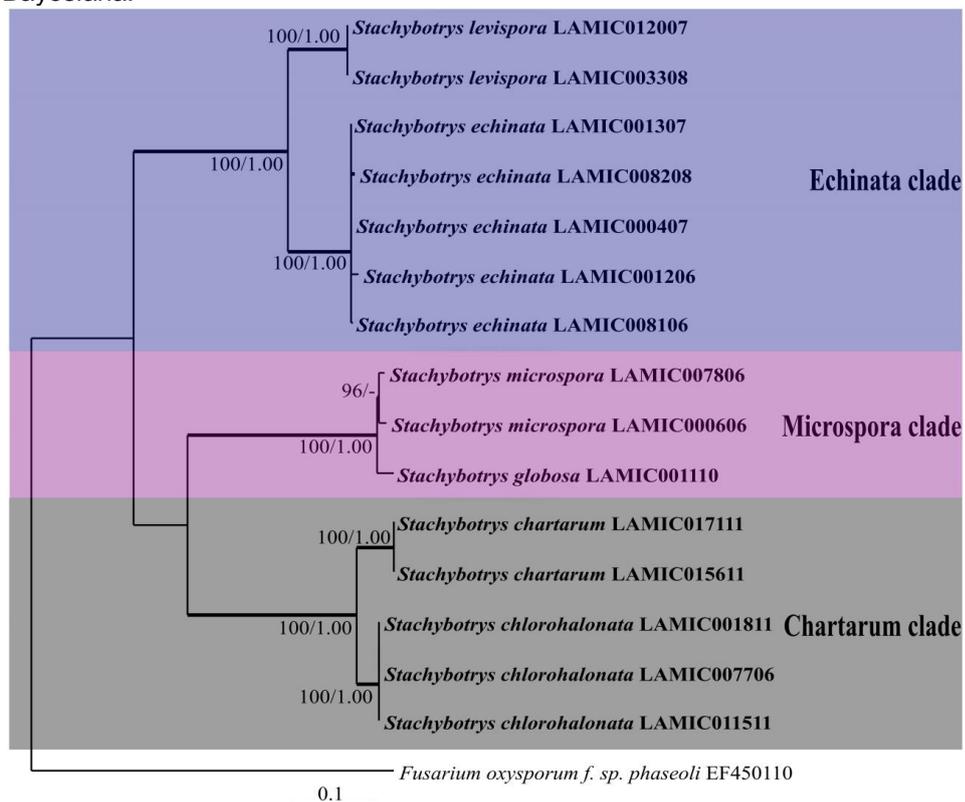


Figura 7. Filograma do complexo *Stachybotrys-Memnoniella* gerado a partir de análise de Máxima Verossimilhança de matriz gerada com se quências do marcador β -TUB2. Os valores nos cladogramas correspondem ao suporte de bootstrap da Máxima Verossimilhança e probabilidade posterior da Inferência Bayesiana.



Na última década, alguns estudos acusaram a existência de espécies crípticas dentro de *S. chartarum* (Cruse *et al.*, 2002, Andersen *et al.* 2002, 2003, Koster *et al.* 2003), incluindo a proposta de uma nova espécie, *S. chlorohalonata* (Andersen *et al.* 2003) contudo, não há diferenças morfológicas que justifique a separação, porém a separação foi realizada pela presença de dois quimiótipos: *S. chartarum*, que produz tricotecenos macrocíclicos e *S. chlorohalonata*, que produz atranones. *Stachybotrys chlorohalonata* foi proposta, apresentando a produção de metabólitos esverdeados (Andersen *et al.* 2003). No entanto, Li & Yang (2005) realizaram um estudo morfológico das culturas e PCR com primers específicos para *S. chartarum*, para tentar diferenciar *S. chartarum*, *S. chlorohalonata* e *S. yunnanensis*, e não houve diferenciação. No presente estudo, a separação entre as duas espécies foi suportada na análise de ML utilizando β -TUB1, e nas duas análises com β -TUB2. O resultado corrobora a utilização dos fragmentos do codificante β -tubulina como DNAbarcodes em *Stachybotrys*.

Um rearranjo importante poderia ser feito no clado Reniformis. Este clado incluiu sequências de *S. reniformis* Tubaki e *S. aloeticola* L. Lombard & Crous. *Stachybotrys nephrospora* (ATCC 18839) é a cultura tipo de *S. reniformis* e foi usada por Jong & Davis (1976) para indicar que *S. reniformis* era provavelmente um espécime de *S. nephrospora*. Portanto, *S. nephrospora* é um nome incorreto que a comunidade científica (Haugland & Heckman 1998, Haugland *et al.* 2001, Wang *et al.* 2015), e coleções de culturas vêm atualmente utilizando (<http://www.atcc.org/products/all/18839.aspx#history>). Entretanto, em nosso estudo as sequências obtidas de *S. nephrospora* provenientes do Brasil agruparam junto, enquanto *S. reniformis* (ATCC 18839 – atualmente *S. nephrospora*) se agrupou com *S. aloeticola*. Este resultado mostra que *S. reniformis* (ATCC 18839) e *S. nephrospora* não são coespecíficas (Figuras 2 e 3). Estes dados corroboram com Wang *et al.* (2015) os quais indicaram que *S. reniformis* e *S. nephrospora* são espécies distintas. Ilustrações de *S. nephrospora* coletadas no Brasil estão disponíveis em Santa Izabel *et al.* (2010).

Memnoniella levispora, que não havia sido estudada por dados moleculares, neste estudo foi incorporada ao clado *Stachybotrys*, como grupo irmão de *S. echinata* (Fig. 1). *Memnoniella levispora* tem conídios com paredes lisas (Subramanian, 1954), enquanto *S. echinata* possui conídios verrucosos (Jong & Davis 1976), os resultados da análise filogenética sugere que estas características

morfológicas procedem para diferenciá-las morfologicamente (Figuras 2-6). Este resultado corrobora para a combinação de *M. levispora* para *Stachybotrys levispora*. Em estudo das relações filogenéticas no complexo *Stachybotrys-Memnoniella*, Haugland *et al.* (2001) apresenta uma filogenia onde sequências de *Memnoniella* (*M. echinata* e *M. subsimplex*) se agrupam dentro do gênero *Stachybotrys*. A partir deste trabalho diversos autores (Pinruan *et al.*, 2004; Koster *et al.*, 2009; Seifert *et al.* 2011, Jie *et al.* 2013) consideram a sinonímia entre estes dois gêneros. No entanto, nem todas as espécies foram analisadas filogeneticamente e propostas as sinonímias. Outros autores propuseram espécies novas e novos registros de *Memnoniella* mesmo após os trabalhos de Haugland *et al.* (2001) (Pholita *et al.* 2003; Keshava Prasad *et al.* 2003; Monoharachary *et al.* 2006, Gond *et al.* 2013). Uma vez que a espécie-tipo *Memnoniella echinata* foi combinada por Smith (1962) para *Stachybotrys echinata* (Rivolta) G. Sm., corroborado por Haugland *et al.* (2001), considera-se a sinonimização de *Stachybotrys* e *Memnoniella*, combinando todos os nomes de *Memnoniella* para *Stachybotrys* e invalidando a combinação de *Memnoniella stilboidea* (Munjal & J.N. Kapoor) M.B. Ellis (Ellis, 1976) para o basônimo *Stachybotrys stilboidea* Munjal & J.N. Kapoor.

Em estudo recente, Wang *et al.* (2015) combinou as espécies remanescentes de *Memnoniella* para *Stachybotrys*, seguindo os trabalhos filogenéticos anteriores.

3.2. COMPLEXO PHALANGISPORA-SPEIROPIS-WIESNERIOMYCES

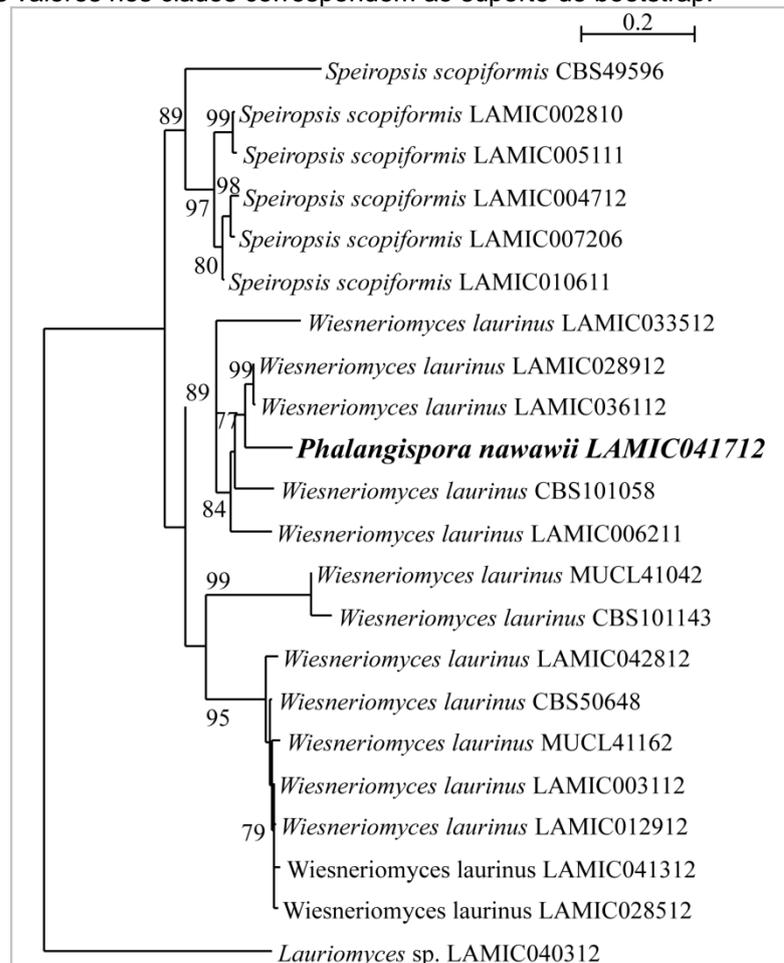
Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces formam um grupo monofilético. Dentro do complexo foi possível estabelecer dois clados: *Speiropsis* e *Wiesneriomyces*. *Speiropsis pedatospora*, que havia sido localizada anteriormente em Jahnulales (Dothideomycetes) por Prihatini *et al.* (2008), foi estabelecida dentro da família *Wiesneriomycetaceae*. Já *Phalangispora nawawii* se agrupou dentro do gênero *Wiesneriomyces* (Figuras 8-10).

O gênero *Speiropsis* havia sido localizado na ordem Jahnulales uma vez que as duas sequências de *S. pedatospora* utilizadas naquele estudo (FJ887927, FJ887926) agruparam com outros gêneros (*Jahnula*, *Xylomyces* e *Brachiosphaera*) pelo papel ecológico, estratégias de adaptação ao ambiente aquático e características das culturas semelhantes, ignorando a ontogenia, i.e., o processo de conidiogênese. Prihatini *et al.* (2008), reconheceram que “os traços morfológicos limitados tornam impossível determinar se eles pertencem à mesma ordem”,

valendo-se apenas das análises com dados moleculares equivocados. O mesmo artigo ainda é citado por Raja & Shearer (2006) e Suetrong *et. al.* 2011. Durante o processo de comparação com as sequências do GenBank, as sequências utilizadas no presente estudo não obtiveram valores de similaridade satisfatórios para reconhece-las como aparentadas. Utilizando sequências de isolados do Semiárido Brasileiro e de culturas de referência da CBS, MUCL e JCM, localizamos *Speiropsis* dentro da família Wiesneriomycetaceae, grupo-irmão da ordem Tubeufiales (Figura 8).

A diferença morfológica entre *Speiropsis pedatospora* e *S. scopiformis* foi corroborada nos agrupamentos, comprovando que conídios em cadeias ramificadas e não-ramificadas são características úteis para distinguir as espécies neste gênero.

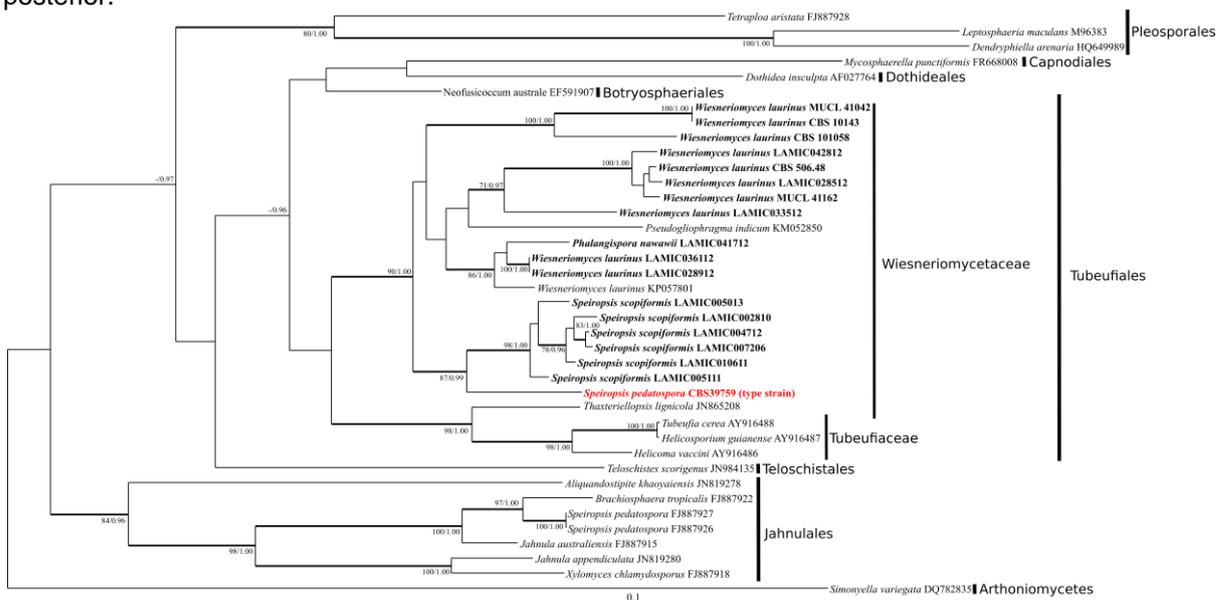
Figura 8. Filograma do complexo *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces* gerado a partir de análise de Máxima Verossimilhança de matriz combinada com os marcadores ITS, LSU, β -tubulina 1 e β -tubulina 2. Os valores nos cladogramas correspondem ao suporte de bootstrap.



A principal característica comum a *Phalangispora* e *Wiesneriomyces* é a presença de conidióforos organizados em esporódóquio com setas (Figura 1). O presente estudo mostra ambos apresentam-se como mesmo gênero e que conídios ramificados e não ramificados, respectivos a *Phalangispora* e *Wiesneriomyces* não é uma característica satisfatória para separá-los.

Diferentemente de Suetrong *et al.* (2014) e Pratibha *et al.* (2014), nosso estudo constatou que *Pseudogliophragma indicum* Phadke & V.G. Rao, *W. conjunctoporus* e *Phalangispora nawawii* são parafiléticos para *W. laurinus* (Figuras 8-10). Com esse resultado, propusemos a sinonimização para *W. laurinus*.

Figura 9. Filograma do complexo *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces* gerado a partir de análise de Máxima Verossimilhança, utilizando o marcador ITS, com representantes da classe Dothideomycetes. Os valores nos cladogramas correspondem ao suporte de bootstrap e probabilidade posterior.



Taxonomia

Wiesneriomyces laurinus (Tassi) P.M. Kirk, Transactions of the British Mycological Society 82 (4): 748 (1984)

≡ *Volutellaria laurina* Tassi, Atti Della Reale Accademia Dei Fisiocritici In Siena 8: 551 (1897)

≡ *Chaetopeltis laurina* (Tassi) Sacc., Bollettino del Laboratorio de Orto Botanico Reale Universita Siena 1: 14 (1898)

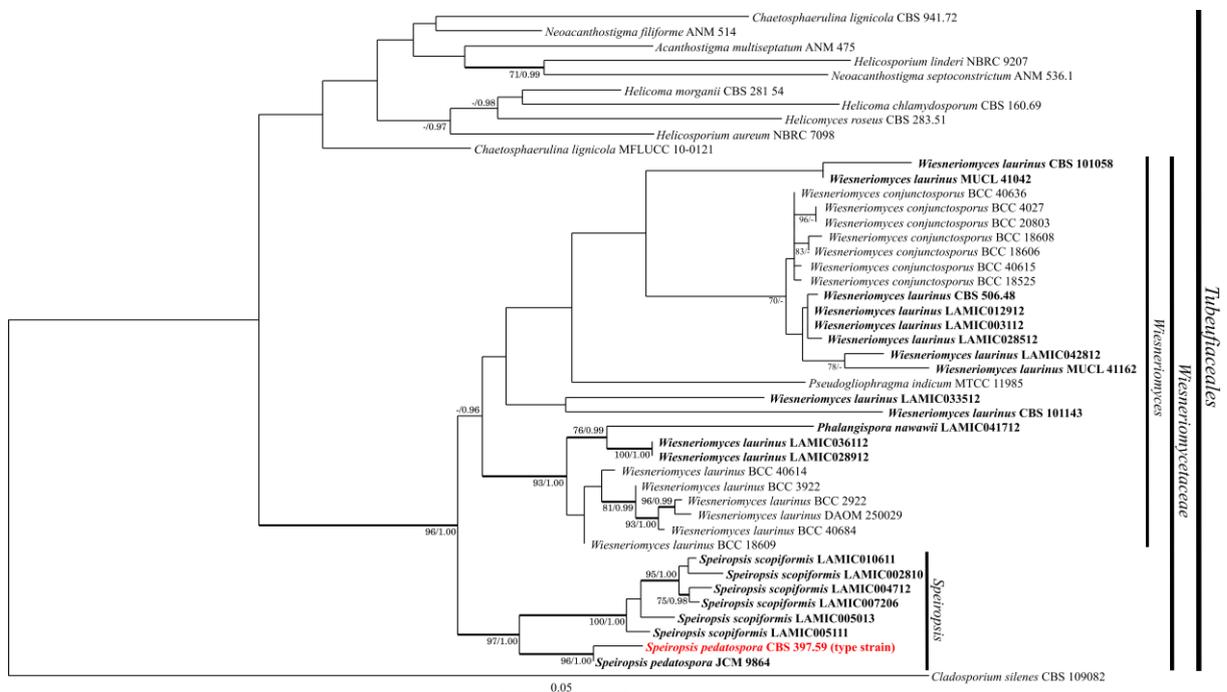
≡ *Tassia laurina* (Tassi) Syd. & P. Syd., Annales Mycologici 17 (1): 44 (1919)

≡ *Pseudogliophragma indicum* Phadke & V.G. Rao, Norwegian Journal of Botany 27: 127 (1980)

≡ *Phalangispora nawawii* Kuthub., Transactions of the British Mycological Society 89 (3): 419 (1987)

= *Wiesneriomyces conjunctosporus* Kuthub. & Nawawi, Transactions of the British Mycological Society 90: 619 (1988)

Figura 10. Filograma do complexo *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces* gerado a partir de análise de Máxima Verossimilhança, utilizando o marcador ITS-LSU, incluindo sequências de *W. conjunctosporus*, utilizadas por Suetrong *et al.* (2014). Os valores nos cladogramas correspondem ao suporte de bootstrap e probabilidade posterior.



Em comunicação pessoal a Nawawi & Webster 1982, B. C. Sutton afirmou que *Wiesneriomyces* pertencem a um grupo de gêneros os quais incluem *Wiesneriomyces*, *Speiropsis*, *Abgliophragma* R.Y. Roy & Gujarati, *Gliophragma* Subram. & Lodha e *Pseudogliophragma* Phadke & V.G. Rao. Todos eles caracterizados pelos conídios conectados por um istmo e a conidiogênese simpodial holoblástica a partir de células conidiogênicas poliblásticas. No entanto, a falta de culturas para esses gêneros dificulta a comparação a nível molecular. Portanto, novos trabalhos com a inclusão desses outros gêneros tornam-se necessários para uma melhor compreensão das relações desse grupo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS OU CONCLUSÃO

Sobre o complexo *Stachybotrys-Memnoniella* é possível concluir que trata-se de um único gênero, com os representantes de *Memnoniella* inseridos dentro do clado *Stachybotrys*, corroborando para a tese de que a principal diferença morfológica entre os representantes refere-se à plasticidade fenotípica. Além disso, as espécies *Stachybotrys globosa* e *S. microspora* foram sinonimizadas, assim como *S. chartarum* e *S. chlorohalonata*.

Em relação ao complexo *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces*, trata-se de um grupo monofilético, inserido na família Wiesneriomycetaceae (Dothideomycetes). Dentro deste grupo, *Wiesneriomyces* figura como grupo-irmão de *Speiropsis*. Já *Phalangispora* foi localizado dentro de *Wiesneriomyces*. Estes resultados dizem respeito à importância da conidiogênese holoblástica, conídios agrupados por istmos estreitos, o arranjo do conidioma e presença-ausência de seta como apomorfia deste grupo.

Os resultados deste trabalho sugerem a disposição de sequências das demais espécies de *Stachybotrys* e *Memnoniella* para ampliar o conhecimento acerca da relação dessas espécies dentro do clado *Stachybotrys*, como também de representantes de gêneros aparentados morfológicamente ao complexo *Phalangispora-Speiropsis-Wiesneriomyces*, com o intuito de testar a homologia de suas células conidiogênicas e conídios na filogenia molecular.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. Ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 869 p.
- ANDERSEN, B.; NIELSEN, K. F.; JARVIS, B. B. Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. **Mycologia**, v.94, p.392-403, 2002.
- ANDERSEN, B.; NIELSEN, K. F.; THRANE, U.; SZARO, T.; TAYLOR, J. W.; JARVIS, B. B. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. **Mycologia**, v.95, p.1227-1238, 2003.
- BARBOSA, F. F.; GUSMÃO, L. F. P. Two Speiropsis species (Anamorphic Fungi - Hyphomycetes) from Bahia State, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v.19, p.515-518, 2005.
- BEGEROW, D.; NILSSON, H.; UNTERSEHER, M.; MAIER, W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, p.99-108, 2010.
- BISBY, G. R. *Stachybotrys*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.26, p.133-143, 1943.
- CANNON, P. F.; KIRK, P. M. The philosophy and practicalities of amalgamating anamorph and teleomorph concepts. **Studies in Mycology**, v.45, p.19-25, 2000.
- CASTLEBURY, L. A.; ROSSMAN, A. Y.; SUNG, GI-HO; HYTEN, A. S.; SPATAFORA, J. W. Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. **Mycological Research**, v.108, p.864-872, 2004.
- CARMICHAEL, J. W.; KENDRICK, W. B.; CONNERS, I. L.; SIGLER, L. **Genera of Hyphomycetes**. Edmonton: The University of Alberta Press, 1980. 386 p.
- CORDA, A. C. I. **Icones Fungorum hucusque cognitorum**: v.1. Praga: Publicado pelo autor, 1837.
- CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J.; GUARRO, J.; HERNÁNDEZ-RESTREPO, M.; SUTTON, D. A.; ACHARYA, K.; *et al.* Fungal Planet description sheets: 320-370. **Persoonia**, v.34, p.167-266, 2015.
- CRUSE, M.; TELERANT, R.; GALLAGHER, T.; LEE, T.; TAYLOR, J. W. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. **Mycologia**, v.94, p.814-822, 2002.
- DEIGHTON, F. C. African fungi. I. **Mycological Papers**, v.78, p.1-43, 1960.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequences alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.1792-1797, 2004.

EBERSBERGER, I.; SIMOES, R. M.; KUPCZOC, A.; GUBE, M.; KOTHE, E.; VOIGT, K.; HAESLER, A. A Consistent Phylogenetic Backbone for the Fungi. **Molecular Biology and Evolution**, v.29, p.1319-1334, 2012.

Ehrenberg, C. G. **Sylvae mycologicae Berolinenses**. :1-32, 1818.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608 p.

ELLIS, M. B. More **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 1976. 507 p.

GALLOWAY, L. D. Note on an unusual mould fungus. **Transactions of the British Mycological Society**, v.18, p.163-166, 1933.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1323-1330, 1995.

GOND, A. K.; PATEL, R.; PATEL, S.; JAMALUDDIN; PANDY, A. K. New record of *Memnoniella levispora* Subram on *Ficus carica* L from India. **Journal on New Biological Reports**, v.2, p.272-274, 2013.

GRANDI, R. A. P.; GUSMÃO, L. F. P. Hyphomycetes com conidioma dos tipos esporóquio e sinema associados a folhas de *Cedrela fissilis* (Meliaceae) em Maringá, PR, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.11, p.123-134, 1997.

HAUGLAND, R. A.; HECKMAN, J. L. Identification of putative sequence specific PCR primers for detection of the toxigenic fungal species *Stachybotrys chartarum*. **Molecular and Cellular Probes**, v.12, p.387-396, 1998.

HAUGLAND, R. A.; VESPER, S. J.; HARMON, S. M. Phylogenetic relationships of *Memnoniella* and *Stachybotrys* species and evaluation of morphological features for *Memnoniella* species identification. **Mycologia**, v.93, p.54-65, 2001.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v.105, p.1422-1432, 2001.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; *et al.* A high-level phylogenetic classification of the *Fungi*. **Mycological Research**, v.111, p.509-547, 2007.

HÖHNEL, F. *Memnoniella* Höhn. n.g. **Centralbl Bakt** 2, v.60, p.6-17, 1923.

Humber, R. A. *Entomophthoromycota*: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. **Mycotaxon**, v.120, p.477-492. 2012.

HUELSENBECK, J.P., RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v.17, p.754-755, 2001.

- HUGHES, S. J. Revisiones Hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis. **Canadian Journal of Botany**, v.36, p.727-836, 1958.
- HUMBER, R. A. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. **Mycotaxon**, v.120, p.477-492, 2012.
- JIE, C. Y.; GENG, K.; JIANG, Y. L.; XU, J. J.; HYDE, K. D.; MCKENZIE, E. H. C.; ZHANG, T. Y.; BAHKALI, A. H.; LI, D. W.; WANG, Y. *Stachybotrys* from soil in China, identified by morphology and molecular phylogeny. **Mycological Progress**, v.12, p.693-698, 2013.
- JONES, M. D. M.; FORN, I.; GADELHA, C.; EGAN, M. J.; BASS, D.; MASSANA, R.; RICHARDS, T. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. **Nature**, v.474, 200-205, 2011.
- JONG, S. C.; DAVIS, E. E. Contribution to the knowledge of *Stachybotrys* and *Memnoniella* in culture. **Mycotaxon**, v.3, p.409-486, 1976.
- KENDRICK, B. **The Fifth Kingdom**. 3. Ed. Waterloo: Mycolog Publications, 2001. 386 p.
- KESHAVA PRASAD, T. S.; ASHA, L. G.; BHAT, D. J. A new species of *Memnoniella* from India. **Mycotaxon**, v.85, p.341-344, 2003.
- KESHAVA PRASAD, T. S.; BHAT, D. J. *Speiropsis rogergoosensis* sp. nov. from India. **Mycotaxon**, v.82: p.127-131, 2002.
- KIRK, P. M. New or interesting microfungi X. Hyphomycetes on *Laurus nobilis* leaf litter. **Mycotaxon**, v.18, p.259-298, 1983.
- KIRK, P. M. *Volutellaria laurina* Tassi, an earlier name for *Wiesneriomyces javanicus* Koorders. **Transactions of the British Mycological Society**, v.82, p.748-749, 1984.
- KIRK, P. M. *Memnoniella echinata*. **IMI Descriptions of Fungi and Bacteria**, v.1055, p.1-2, 1991.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER D. W.; STALPERS J. A. **Dictionary of the Fungi**. 10. Ed. Wallingford: CABI, 2008.
- KOORDERS, S. H. Botanische Untersuchungen. **Verhandelingen Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Afdeling Natuurkunde**, v.13, p.1-264. 1907.
- KOSTER, B.; WONG, B.; MALLOCH, D.; STRAUS, N. A geographically diverse set of isolates indicates two phylogenetic lineages within *Stachybotrys chartarum*. **Canadian Journal of Botany**, v.81, p.633-643, 2003.
- KOSTER, B., WONG, B.; STRAUS, N.; MALLOCH, D. A multi-gene phylogeny for *Stachybotrys* evidences lack of trichodiene synthase (*tri5*) gene for isolates of one of three intrageneric lineages. **Mycological Research**, v.113, p.877-886, 2009.

- KUTHUBUTHEEN, A. J. A new species of *Phalangispora* and further observations on *P. constricta* from Malaysia. **Transactions of the British Mycological Society**, v.89, p.414-420, 1987.
- KUTHUBUTHEEN, A. J.; NAWAWI, A. A new species of *Wiesneriomyces* (Hyphomycetes) from submerged decaying leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, v.90, p.619-625, 1988.
- LI, D.-W.; YANG, C. S. Taxonomic history and current status of *Stachybotrys chartarum* and related species. **Indoor Air**, v.15, p.5-10, 2005.
- LIS, J. T.; SCHLEIF, R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. **Nucleic Acids Research**, v.2, p.383-389, 1975.
- MADDISON, W.; MADDISON, D. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. **Version 2.75**, 2001.
- MANOTIS, J.; STRAIN, J. W. *Wiesneriomyces javanicus* from Panamanian soil. **Mycologia**, v.60, p.203-208, 1968.
- MATHUR, B. L.; SANKLA, H. C. **SCI. CULT.** 32: 93, 1966.
- MATSUSHIMA, T. **Microfungi of the Solomon Islands and Papua-New Guinea**. Osaka: The Nippon Printing & Publishing Co., 1971a.
- MATSUSHIMA, T. Some interesting Fungi Imperfecti. **Bulletin of the National Science Museum of Tokyo**, v.14, p.460-480, 1971b.
- MATSUSHIMA, T. **Icones Microfungorum a Matsushima Lectorum**. Kobe: Takashi Matsushima, 1975.
- MATSUSHIMA, T. **Saprophytic Microfungi from Taiwan. Part 1: Hyphomycetes**. Matsushima Mycological Memoirs n^o 1. Kobe: Matsushima Fungus Collection, 1980.
- MANOTIS, J.; STRAIN, J. W. *Wiesneriomyces javanicus* from Panamanian soil. **Mycologia**, v.60, p.203-208, 1968.
- MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees". In **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, New Orleans, 14 Nov. 2010. 1-8 p.
- MISRA, P. C.; SRIVASTAVA, S. K. Two underscribed *Stachybotrys* species from India. **Transactions of the British Mycological Society**, v.78, p.556-559, 1982.
- MONOHARACHARY, C.; AGARWAL, D. K.; SURESHKUMAR, G.; KUNWAR, I. K.; BABU, K. S. *Memnoniella mohanramii* sp. nov. and *Zygosporium anupamvarmae* sp. nov. from India. **Indian Phytopathology**, v.59, p.489-491, 2006.

- NAWAWI, A.; WEBSTER, J. *Phalangispora constricta* gen. et sp. nov., a sporodochial hyphomycete with branched conidia. **Transactions of the British Mycological Society**, v.79, p.65-68, 1982.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.7, p.103-116, 1997.
- O'BRIEN, H. E.; PARRENT, J. L.; JACKSON, J. A.; MONCALVO, J.-M.; VILGALYS, R. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.5544-5550, 2005.
- PADWICK, G. W. Notes on Indian fungi. III. **CMI Mycological Papers**, v.12, p.1-15, 1945.
- PHOLITA W.; LUMYONG P.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D.; LUMYONG, S. *Memnoniella* and *Stachybotrys* species from *Musa acuminata*. **Cryptogamie, Mycologie**, v.24, p.147-152, 2003.
- PINRUAN, U.; MCKENZIE, E. H. C.; JONES, E. B. G.; HYDE, K. D. Two new species of *Stachybotrys*, and a key to the genus. **Fungal Diversity**, v.17, p.145-157, 2004.
- PRATIBHA, J.; NGUYEN, H. D. T.; MEL'NIK, V. A.; BHAT, D. J.; WHITE, G. P.; SEIFERT, K. A. Lectotypification, epitypification, and molecular phylogeny of the synnematus hyphomycete *Pseudogliophragma indicum*, the second genus in the Wiesneriomycetaceae. **Mycoscience**, v.30, p.1-9, (2014).
- PRIHATINI, R.; BOONYUEN, N.; SIVICHAI, S. Phylogenetic Evidence that Two Submerged-Habitat Fungal Species, *Speiropsis pedatospora* and *Xylomyces chlamydosporus*, Belong to the Order Jahnulales Insertae Sedis Dothideomycetes. **Microbiology Indonesia**, v.2, p.136-140, 2008.
- RAJA, H.; SHEARER, C. A. *Jahnula* species from North and Central America, including three new species. **Mycologia**, v.98, p.319-332, 2006.
- SANTA IZABEL, T. S.; CRUZ, A. C. R.; BARBOSA, F. R.; FERREIRA, S. M. L.; MARQUES, M. F. O.; GUSMÃO, L. F. P. The genus *Stachybotrys* (anamorphic Fungi) in the semi-arid region of Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, p.479-487, 2010.
- SCHOCH, C. L.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; BOEHM, E. W. A.; BURGESS, T. I.; DE GRUYTER, J.; *et al.* A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. **Studies in Mycology**, v.64, p.1-15, 2009.
- SEENA, S.; PASCOAL, C.; MARVANOVÁ, L.; CÁSSIO, F. DNA barcoding of Fungi: a case study using ITS sequences for identifying aquatic hyphomycete species. **Fungal Diversity**, v.44, p.77-87, 2010.

- SEIFERT, K. A. Progress towards DNA barcoding of Fungi. **Molecular Ecology Resources**, v.9, p.83-89, 2009.
- SEIFERT, K.; MORGAN-JONES, G.; GAMS, W.; KENDRICK, B. **The Genera of Hyphomycetes**. 2. Ed. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2011.
- SELKE, S. B. C. **Distribution and occurrence of *Stachybotrys chartarum* in North Central Florida habitats**. Dissertação apresentada para a Graduate School Of The University Of Florida para obtenção do grau de Ph.D. 2007.
- SHAW, D.; SUTTON, B. C. A new aero-aquatic hyphomycete from Papua New Guinea and Australia. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.91, p.25-36, 1985.
- SWOFFORD, D. L. **PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)**. Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.
- SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultura, 1995.
- SMITH, G. Some new and interesting species of microfungi. III. **Transactions of the British Mycological Society**, v.45, p.387-394, 1962.
- STADEN, R. The Staden Sequence Analysis Package. **Molecular Biotechnology**, v.5, p.233-241, 1996.
- STAJICH, J. E.; BERBEE, M. L.; BLACKWELL, M.; HIBBETT, D. S.; JAMES, T. Y.; SPATAFORA, J. W.; TAYLOR, J. W. The fungi. **Current Biology**, v.19, p.R840-R845, 2009.
- STAMATAKIS, A. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. **Bioinformatics**, v.30, p.1312-1313, 2014.
- SUBRAMANIAN, C. V. Hyphomycetes 1. **Journal of the Indian Botanical Society**, v.35, p.53-91, 1956.
- SUETRONG, S.; BOONYUEN, N.; PANG, K.; UEAPATTANAKIT, J.; KLAYSUBAN, A.; SRI-INDRASUTDHI, V.; SIVICHAI, S. GARETH JONES, E. B. A taxonomic revision and phylogenetic reconstruction of the Jahnulales (Dothideomycetes), and the new family Manglicolaceae. **Fungal Diversity**, v.51, p.163-188, 2011.
- SUGIYAMA, J. Relatedness, phylogeny, and evolution of the Fungi. **Mycoscience**, v.39, p.487-511, 1998.
- TUBAKI, K. Studies on the Japanese Hyphomycetes. V. Leaf & stem group with a discussion of the classification of the Hyphomycetes and their perfect stages. **Journal of the Hattori Botanical Laboratory**, v.20, p.142-244, 1958.
- VILGALYS, R. Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. **Vilgalys Lab, Durham, NC**. Disponível em: <<http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>> Acesso em: 12 jan. 2015.

WANG, Y., HYDE, K. D., MCKENZIE, E. H. C., JIANG, Y.-L., LI, D.-W., ZHAO, D.-G. Overview of *Stachybotrys* (*Memnoniella*) and current species status. **Fungal Diversity**, v.71, p.17-83, 2015.

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to Fungi**. 3. Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies**. p.315-322. In: INNIS, M. A; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T.J. **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, 1990.

ZUCK, R. K. Isolates intermediate between *Stachybotrys* and *Memnoniella*. **Mycologia**, v.38, p.69-76, 1946.