



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

KARLA TORRES LINS DE SOUSA FREIRE

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE ESPÉCIES DO COMPLEXO
Cladosporium cladosporioides DEPOSITADAS NA MICOTECA URM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**RECIFE
2015**

KARLA TORRES LINS DE SOUSA FREIRE

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE ESPÉCIES DO COMPLEXO
Cladosporium cladosporioides DEPOSITADAS NA MICOTECA URM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Taxonomia e ecologia de Fungos

Orientador: Dra. Cristina Maria de Souza Motta

Co-orientador: Dra. Neiva Tinti de Oliveira

**RECIFE
2015**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Freire, Karla Torres Lins de Sousa

Caracterização taxonômica de espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides* depositadas na micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco/ Karla Torres Lins de Sousa Freire– Recife: O Autor, 2015.

58 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta

Coorientadora: Neiva Tinti de Oliveira

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

Inclui referências

- 1. Cladosporium 2. Filogenia 3. Fungos I. Motta, Cristina Maria de Souza (orientadora) II. Oliveira, Neiva Tinti (coorientadora) III. Título**

579.56

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-053

KARLA TORRES LINS DE SOUSA FREIRE

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE ESPÉCIES DO COMPLEXO
Cladosporium cladosporioides DEPOSITADAS NA MICOTECA URM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovado em: 27/02/2015

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cristina Maria de Souza-Motta – (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Laura Mesquita Paiva – (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Nelson Manuel Viana da Silva Lima – (Examinador Externo)
Universidade do Minho – Braga, Portugal

Dr. Gladstone Alves da Silva – (Suplente interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Virgínia Michelle Svedese – (Suplente externo)
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Dedico aos meus pais e minhas irmãs por sempre torcerem por mim e estarem sempre ao meu lado, em especial à minha mãe, pelo amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir a realização deste trabalho, por sempre me proteger e por iluminar os meus caminhos.

Aos meus pais, Carlos Alberto de Sousa Freire e Rosalva Torres Lins de Sousa Freire pelo amor incondicional. Em especial, à minha mãe por todo amor, carinho, atenção, incentivo e força em todos os momentos da minha vida sem permitir que eu abaixe a cabeça e me fazendo acreditar em mim. Por estar sempre ao meu lado e ser exemplo na minha vida. Obrigada por tudo. Às minhas amadas irmãs Jayne Freire e Julyana Freire pela paciência, companheirismo, amizade. Amo muito vocês.

À Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio durante os dois anos de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

Ao Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e a chefe do Departamento Prof^a. Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta pelo espaço e materiais disponibilizados para realização desta dissertação e todos que fazem parte da Micoteca URM. Ao Laboratório de Biologia Molecular e do Laboratório de Citologia e Genética.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos pelo apoio.

À minha orientadora, Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta pela dedicação, atenção, paciência e credibilidade dispensadas no auxílio da concretização desta dissertação.

À Professora Dr^a. Laura Mesquita Paiva, por me acolher no laboratório e ser sempre tão amiga, atenciosa e compreensiva. Obrigada por toda ajuda, apoio e dedicação desde o início e por ser referência profissional e pessoal para todos nós.

Aos meus queridos amigos, Dianny Vasconcelos, por cada palavra de incentivo quando mais precisei, pela paciência e, principalmente, pela força e motivação. Obrigada pela amizade que construímos. À Gianne Rizutto, pela amizade em todas as horas. Obrigada por cada momento compartilhado, por estar sempre do meu lado e ser sempre tão atenciosa e companheira, muito bom saber que posso contar com você. À Jadson Bezerra, por toda dedicação e apoio constantes durante a realização deste trabalho e de todos os outros, obrigada por estar sempre presente e disposto a me ajudar. À Renan Nascimento pelo apoio e por não medir esforços para me ajudar, estando sempre à disposição. Obrigada por toda ajuda em cada etapa deste trabalho, pelo tempo gasto e dedicação com esta dissertação. Sem vocês eu não teria conseguido concluir este trabalho.

A todos do Departamento de Micologia e da turma 2013 do Mestrado em Biologia de Fungos pela amizade.

A toda minha família, por todo carinho e incentivo.

A todos os meus grandes amigos pelas palavras de incentivo e por sempre torcerem por mim, mesmo distantes.

À grande equipe do Laboratório de Citologia e Genética, agradeço a cada um pelo companheirismo, por toda ajuda quando precisei, pela paciência e momentos compartilhados.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para essa conquista. Muito obrigada.

*“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro
passo para a vitória é o desejo de vencer”*
Gandhi

RESUMO

Diante da crescente necessidade de um rigor taxonômico e do grande número de espécies de fungos que ainda existem para ser revisada e descrita, a identificação baseada apenas em características morfológicas não fornece dados suficientes para uma correta identificação de um grande número de espécies, inclusive aquelas pertencentes ao Complexo *Cladosporium cladosporioides*. Desta forma, estudos de biologia molecular vem sendo adicionados ao método tradicional com o intuito de fornecer dados mais precisos, auxiliando no processo de distinção de espécies morfológicamente próximas. Neste contexto, este estudo teve como objetivo caracterizar taxonomicamente espécies pertencentes ao Complexo *Cladosporium cladosporioides* depositadas na Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco por abordagem morfológica e molecular. Para isso, foram utilizadas 40 culturas de fungos pertencentes às espécies *C. cladosporioides* (32) e *C. tenuissimum* (8) e realizadas análises das características macroscópicas dos fungos através do cultivo em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar), MEA (Extrato de Malte Ágar), SNA (Synthetic Nutrient-poor Agar) e AO (ágar aveia) por um período de 14 dias a 25°C no escuro, e microscópicas através de culturas crescidas em meio SNA e BDA por 7 dias sob luz UVA contínua. Para as análises moleculares, foi realizado o sequenciamento parcial da região ITS, e dos genes actina (ACT) e do fator de alongamento da tradução (*tef1*). Através da ferramenta BLAST, todas as culturas de fungos utilizadas neste estudo apresentaram identidade igual ou superior a 97% com sequências de fungos do gênero *Cladosporium* depositadas no Banco de dados GenBank para as regiões ITS1-5,8S-ITS2, e os genes ACT e *tef1*. Outras sequências de referência foram utilizadas para o alinhamento nesse estudo e após a reconstrução filogenética mais parcimoniosa foi constatado que 30 culturas pertencem ao Complexo *Cladosporium cladosporioides* e 6 ao Complexo *Cladosporium sphaerospermum*. Sendo assim, os genes ACT e o *tef1* foram considerados os marcadores moleculares com maior poder de resolução para as espécies pertencentes ao Complexo *Cladosporium cladosporioides*. Desta forma, foi possível atualizar o status taxonômico das culturas das espécies *C. cladosporioides* e *C. tenuissimum* depositadas na Micoteca URM da UFPE.

Palavras-chave: *Cladosporium cladosporioides*. Filogenia. Taxonomia.

ABSTRACT

Given the growing need for taxonomic accuracy and the large number of fungal species that still exist to be reviewed and described, only identification based on morphological characteristics does not provide sufficient data for a correct identification of a large number of species, including those belonging to *Cladosporium cladosporioides* complex. Thus, molecular biology studies have been added to the conventional method in order to provide more accurate data, helping the process of morphologically distinguish closely related species. In this context, this study aimed to characterize taxonomically species of the *Cladosporium cladosporioides* complex deposited in the URM Culture Collection of the Federal University of Pernambuco by morphological and molecular approach. For this, we used 40 fungal cultures belonging species *C. cladosporioides* (32) and *C. tenuissimum* (8) and carried out analyzes of macroscopic characteristics of fungi by growing in PDA culture medium (Potato Dextrose Agar), MEA (Extract Malt agar), SNA (Synthetic Nutrient-poor agar) and AO (oatmeal agar) for a period of 14 days at 25 ° C in the dark and microscopic using SNA and cultures grown in PDA medium for 7 days under continuous UV light. For molecular analysis, we performed the partial sequencing of the ITS region, and actin genes (ACT) and the translation elongation factor (TEF1). Through BLAST tool, all cultures of fungi used in this study showed similarity equal to or greater than 97% with fungi of the genus *Cladosporium* sequences deposited in the GenBank database for ITS1-5.8S-ITS2 regions, and ACT genes and TEF1. Other reference sequences were used for this study alignment and phylogenetic reconstruction after most parsimonious 30 was found to belong to the crops *Cladosporium cladosporioides* complex and the 6 to *Cladosporium sphaerospermum* complex. Thus, the ACT and the TEF1 genes were considered molecular markers with higher resolution for the species belonging to *Cladosporium cladosporioides* Complex. Thus, it was possible to update the taxonomic status of the cultures of *C. cladosporioides* and *C. tenuissimum* deposited in the URM Culture Collection of UFPE.

Key-words: *Cladosporium cladosporioides*. Phylogeny. Taxonomy.

Lista de figuras

Pág.

Figura 1. Localização dos genes rDNA nuclear (18S rDNA, 5.8S rDNA, 28S rDNA) e espaços internos transcritos (ITS 1, ITS2).....	17
Figura 2. Conídios e conidióforos de <i>Cladosporium cladosporioides</i> . Fonte: Bensch <i>et al.</i> , (2010).....	22
Figura 3. Conídios e conidióforos de <i>Cladosporium tenuissimum</i> . Fonte: Bensch <i>et al.</i> , (2010).....	23
Figura 4. Características microscópicas de <i>Cladosporium cladosporioides</i> em BDA – A. URM 3080 e SNA : B - URM 3865; C - URM 6119 e D. URM 6703. Características microscópicas de <i>Cladosporium tenuissimum</i> em SNA - E. URM 3721; F. URM 3176 e BDA - G. URM 3387.....	37
Figura 5. Características macroscópicas de <i>Cladosporium cladosporioides</i> em BDA. A. URM 2567; B. URM 4837; C. URM 3386; D. URM 3865; E. URM 5349; F. URM 5448; G. URM 6119; H. URM 6246. Características macroscópicas de <i>Cladosporium tenuissimum</i> em BDA. I. URM 4686; J. URM 5632.....	38
Figura 6. Características macroscópicas de <i>Cladosporium cladosporioides</i> em MEA. A. URM 4837; B. URM 6246; C. URM 4168; D. URM 3101; E. URM 4096; F. URM 5736; G. URM 6502; H. URM 3386. Características macroscópicas de <i>Cladosporium tenuissimum</i> . I. URM 5632; J. URM 4032.....	39
Figura 7. Características macroscópicas de <i>Cladosporium cladosporioides</i> em SNA. A. URM 4030; B. URM 3175; C. URM 3204; D. URM 3654; E. URM 4168; F. URM 5736; G. URM 5737; H. URM 5843. Características macroscópicas de <i>Cladosporium tenuissimum</i> . I. URM 4686; J. URM 2972.....	40
Figura 8. Características macroscópicas de <i>Cladosporium cladosporioides</i> em OA. A. URM 4837; B. URM 6246; C. URM 3101; D. URM 3107; E. URM 3865; F. URM 4168; G. URM 5737; H. URM 6502. Características macroscópicas de <i>Cladosporium tenuissimum</i> . I. URM 5632; J. URM 3176.....	45
Figura 9. Reconstrução filogenética de espécies do Complexo <i>Cladosporium cladosporioides</i> depositados na Micoteca URM da UFPE a partir do alinhamento de nucleotídeos relativos à combinação dos fragmentos ITS1 + 5.8S + ITS2 (rDNA), Actina e Fator de alongamento da tradução 1- α	50

Lista de tabelas

Pág.

Tabela 1. Culturas de fungos do gênero <i>Cladosporium</i> depositadas na Micoteca URM da UFPE.....	29
Tabela 2. Número de acesso as sequências de nucleotídeos das espécies do Complexo <i>Cladosporium cladosporioides</i> depositadas no GenBank e utilizadas neste estudo. Regiões ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>), TEF (<i>translation elongation factor 1-alpha</i>) e ACT (partial actin gene).....	33
Tabela 3. Características macroscópicas das culturas de <i>Cladosporium</i> em meio BDA e MEA.....	41
Tabela 4. Características macroscópicas das culturas de <i>Cladosporium</i> em meio OA e SNA.....	41
Tabela 5. Características microscópicas das culturas de <i>Cladosporium</i> em meio SNA.....	46

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 TAXONOMIA MORFOLÓGICA E MOLECULAR.....	16
2.1.1 Técnicas moleculares na identificação de fungos.....	17
2.2 SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA.....	19
2.3 O GÊNERO <i>Cladosporium</i>	20
2.3.1 Complexo <i>Cladosporium cladosporioides</i>	24
2.3.1.1 <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries.....	25
2.3.1.2 <i>Cladosporium tenuissimum</i> Cooke.....	26
2.4 COLEÇÕES DE CULTURAS.....	26
2.4.1 Micoteca URM.....	27
2.4.1.1 Imersão em óleo mineral.....	28
2.4.1.2 Liofilização.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 CULTURAS DE FUNGOS.....	29
3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	30
3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	31
3.3.1 Obtenção do micélio e extração do DNA.....	31
3.3.2 Amplificação e sequenciamento das regiões ITS do rDNA, ACT (actina) e do fator de alongamento da tradução <i>tef1</i>	31
3.3.3 Alinhamento das sequências e análise filogenética.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA.....	34
4.1.1 <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries.....	34
4.1.2 <i>Cladosporium tenuissimum</i> Cooke.....	35

4.2 CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA.....	42
4.2.1 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	42
4.2.2 <i>Cladosporium tenuissimum</i>	43
4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FILOGENÉTICA.....	46
5 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, a identificação dos fungos filamentosos é baseada na análise das características morfológicas macroscópicas e microscópicas, tais como, pigmentação, textura da colônia, forma e cor da hifa, presença ou não de septos, forma de esporos, entre outras estruturas (QUADROS *et al.*, 2009). Com o avanço das pesquisas de investigação científica da riqueza de fungos, outros parâmetros para diferenciação taxonômica foram necessários para auxiliar no processo de distinção de espécies morfológicamente próximas utilizando uma abordagem polifásica, tais como, estudos de produção de metabólitos, proteômica e biologia molecular (FRISVAD; SAMSON, 2004; SAMSON; VARGA, 2009).

Vários estudos tem apresentado a dificuldade dos taxonomistas em determinar as características morfológicas que realmente definem um gênero ou espécie (Guarro *et al.* 1999), com isso, técnicas moleculares estão sendo aplicadas, contribuindo para um melhor entendimento das relações filogenéticas entre diferentes espécies de fungos, assim como, para uma melhor precisão nos estudos de sistemática (AZEVEDO *et al.*, 2006).

O gênero *Cladosporium* (teleomorfo: *Davidiella*) descrito por Link em 1816, pertence à família Cladosporiaceae do Filo Ascomycota e tem *Cladosporium herbarum* como sua espécie tipo (INDEX FUNGORUM, 2014). É considerado um dos maiores gêneros de Hyphomycetes, assim como um dos mais heterogêneos e dele fazem parte mais de 772 nomes, ou seja, variedades, formas e espécies (DUGAN *et al.*, 2004). Esta heterogeneidade, possivelmente esta relacionada a definição imprecisa e abrangente deste gênero na literatura, além da grande variabilidade morfológica apresentada pelas espécies e a ocorrência de algumas espécies em uma grande diversidade de substratos (BENSCH *et al.*, 2012). Atualmente o gênero está inserido no Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Dothideomycetes, Subclasse Dothideomycetidae, Ordem Capnodiales e Família Cladosporiaceae (INDEX FUNGORUM, 2014).

Este gênero possui distribuição cosmopolita e suas espécies são relatadas como importantes agentes na decomposição, deterioração e causadores de alergias no homem e doenças em animais e plantas (BENSCH *et al.*, 2012). Comumente encontrados em todos os tipos de plantas, outros fungos e detritos, são isolados frequentes do solo, alimentos, tintas e matérias orgânicas. São também frequentemente relatados como endófitos (BROWN *et al.*, 1998; EL-MORSY, 2000, BEZERRA *et al.*, 2012, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2015), atuam como invasores secundários em lesões de plantas causadas por fungos fitopatogênicos (ELLIS 1971, 1976), ocorrendo também como hiperparasitas em outros fungos (HEUCHERT *et al.*, 2005). Em plantações, *Cladosporium cladosporioides* é produzido em baixa escala no combate a pulgões (FARIA; MAGALHÃES, 2001). As espécies do gênero produzem conídios pequenos, geralmente formados em cadeias ramificadas e bem adaptados para dispersão por longas distâncias (BENSCH

et al., 2012), sendo estes esporos relatados por alguns autores como o componente fúngico mais comum encontrado no ar (FARR *et al.*, 1989; FLANNIGAN, 2001; MULLINS, 2001).

A forte heterogeneidade do gênero foi confirmada com base nas primeiras análises moleculares realizadas em *Cladosporium* s. lat. por Braun (2003). Além de revisões publicadas sobre *Cladosporium herbarum* s. lat. (SCHUBERT *et al.*, 2007), *C. sphaerospermum* s. lat. (ZALAR *et al.*, 2007, DUGAN *et al.*, 2008) e *C. cladosporioides* s. lat. (BENSCH *et al.*, 2010), onde os autores concluem que estes devem ser considerados como complexos heterogêneos, do qual fazem parte uma grande diversidade de espécies geneticamente e morfológicamente distintas (BENSCH *et al.*, 2012).

O nome *Cladosporium cladosporioides* esteve frequentemente associado a vários táxons que atualmente são considerados distintos, tornando-se necessário uma revisão dos fungos anteriormente classificados com este nome com a finalidade de esclarecer o status taxonômico. Por exemplo, em estudo realizado por Bensch *et al.* (2010), uma análise da sequência de DNA em três regiões do gene foi utilizada com o intuito de elucidar a diversidade de espécies dentro do complexo *Cladosporium cladosporioides*. Estudos de biologia molecular são utilizados como uma ferramenta bastante útil para diferenciar espécies intimamente relacionadas e morfológicamente semelhantes. Atualmente, são consideradas como pertencentes a este complexo 39 espécies (BENSCH *et al.*, 2012).

Geralmente em estudos de revisões e atualizações taxonômicas de fungos, as culturas utilizadas estão preservadas em coleções de culturas. A Micoteca URM Maria Auxiliadora Cavalcanti, localizada no Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, foi fundada em 1954 pelo Prof. Augusto Chaves Batista. A Micoteca está registrada no *Commonwealth Mycological Institute* (CMI) sob a sigla URM (*University Recife Mycologia*) e é filiada ao *World Directory of Collections of Culture of Microorganisms* (WFCC) sob o N° 604. Atualmente, o acervo possui um total de cerca de 25 mil amostras de fungos. Além de receber estas amostras para compor o acervo, a Micoteca URM atende pedidos de fornecimento de amostras, isolamento e identificação de culturas, liofilização e treinamento de estudantes e profissionais na área de taxonomia e preservação, oferecendo também cursos de extensão (MICOTECA, 2013). No acervo desta coleção existem 40 isolados de duas espécies do atual Complexo *Cladosporium cladosporioides*. Como muitos destes foram identificados com base apenas nas características morfológicas e em período anterior aos estudos taxonômicos mais recentes, como aqueles realizados por Bensch *et al.* (2010; 2012), se faz necessário a revisão taxonômica destes isolados utilizando metodologia mais atualizada com base tanto em características morfológicas quanto moleculares, utilizando parte das sequências da região ITS do rDNA e dos genes da actina (ACT) e fator de alongamento da tradução (*tef1*). Neste

contexto, este estudo tem como objetivo caracterizar taxonomicamente espécies pertencentes ao Complexo *Cladosporium cladosporioides* depositadas na Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 TAXONOMIA MORFOLÓGICA E MOLECULAR

O termo taxonomia tem origem grega e significa *taxis* (ordem), e *nomos* (lei, norma). Foi usado pela primeira vez em 1735 pelo cientista e médico sueco Carl Von Linné, com a publicação da versão inicial da obra *Systema Naturae* (AGANETTE *et al.*, 2010). A taxonomia morfológica é hoje definida como um sistema de classificação dos organismos que tem como base a análise dos caracteres fenotípicos destes para classificá-los (CAMACHO *et al.*, 2013), e surgiu da necessidade do homem em classificar, agrupar e organizar os seres vivos com o intuito de facilitar o estudo e compreensão dos organismos (MACHADO, 2006).

Uma abordagem morfológica na identificação de fungos leva em conta alguns aspectos como textura da colônia, diâmetro, velocidade de crescimento, pigmentação, forma e cor da hifa, presença ou não de septos, forma e ornamentação dos esporos, entre outras estruturas (QUADROS *et al.*, 2009). No entanto, este método apresenta limitações por não fornecer informações suficientes no processo de distinção de espécies que são morfolologicamente próximas, visto que, estas características podem variar conforme as condições ambientais, meio de cultura, substrato e condições de incubação, muitas vezes, criando certa dificuldade dos taxonomistas em determinar quais as características fenotípicas que realmente delimitam um gênero ou espécie (OLIVEIRA, 2011; SANTOS *et al.*, 2010; GUARRO *et al.*, 1999). Com isso, entre os anos de 1950 e 1960, a taxonomia foi fortemente influenciada pelas informações obtidas através da citologia e genética, com intuito de ampliar os esquemas tradicionais. Já entre as décadas de 60 e 70, surgiu a taxonomia numérica com o objetivo de analisar em conjunto uma grande quantidade de dados de origens diversas utilizando algoritmos matemáticos. Em seguida, nos anos de 1970/1980 houve uma grande quantidade de trabalhos de quimiotaxonomia associados à taxonomia morfológica, até que, a partir desta década-surgiram os primeiros trabalhos utilizando dados baseados nas sequências de DNA e analisados utilizando-se os princípios da cladística, a chamada sistemática molecular (BARROS, 2013). Desde então, a aplicação dessas técnicas moleculares vem possibilitando uma melhor compreensão a respeito das relações filogenéticas entre diferentes espécies de fungos, assim como,

fornecendo dados importantes que possibilitam a classificação de novas espécies (AZEVEDO *et al.*, 2006).

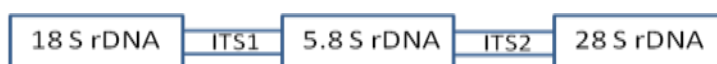
Em contraste com a abordagem exclusivamente fenotípica, estas análises moleculares trazem vantagens, visto que, sequências de DNA são pouco susceptíveis a alterações ambientais como observado nas características morfológicas, fornecendo assim caracteres mais estáveis no processo de identificação de espécies (GOMES, 2011). Frequentemente, estes resultados obtidos através de uma abordagem molecular complementam as hipóteses baseadas em estudos de morfologia, mas em alguns casos, esses dados resultantes da análise do DNA não se mostram completamente de acordo com observações exclusivamente morfológicas (SAMUELS; SEIFERT, 1995). Por exemplo, Zhang *et al.* (1998) compararam dados morfológicos com dados moleculares e distinguiram cinco táxons de *Phomopsis* isolados de soja (*Glycine max*) utilizando sequências da região ITS do DNA ribossomal, mas não obtiveram dados morfológicos capazes de diferenciá-los. Atualmente, existe uma grande combinação de métodos na Biologia Molecular utilizados como ferramenta auxiliar para identificação morfológica de fungos (SHI, 2001).

2.1.1 Técnicas moleculares na identificação de fungos

A reação em cadeia da polimerase (PCR), criada por Karry Mullis em 1985, é um método de análise molecular que permite a obtenção, *in vitro*, de várias cópias de um determinado segmento do DNA através do uso de um par de oligonucleotídeos (*primers*) específicos para região a ser amplificada. Esta técnica gera produtos em quantidades suficientes para análises de DNA mesmo a partir de pequenas quantidades de amostra (Fungaro, 2001). As regiões internas transcritas (ITS - *Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal (rDNA), estão situadas entre regiões altamente conservadas e são o principal alvo da PCR para análise filogenética em fungos (LARENA, 1999).

A região ITS está dividida em ITS1, que separa os genes 18S e 5.8S, e ITS2 que está localizado entre os genes 5.8S e 28S (HILLIS; DIXON, 1991; SCHLOTTERER *et al.*, 1994). Normalmente as regiões 18S, 28S e 5.8S não apresentam variações de sequência, ao contrário das regiões ITS, que evoluem rapidamente, apresentando alto nível de polimorfismo e por isso podem variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento, sendo assim, mais utilizadas e apropriadas para discriminação de espécies próximas ou até variedades de uma mesma espécie.

Figura 1 - Localização dos genes rDNA nuclear (18S rDNA, 5.8S rDNA, 28S rDNA) e espaços internos transcritos (ITS 1, ITS2)



Além disso, essas sequências aparecerem em grande número de cópias no genoma e são relativamente curtas, geralmente apresentando entre 600 e 800 pares de bases de comprimento, podendo ser mais facilmente sequenciadas e amplificadas. Como consequência dessas vantagens, existe atualmente um grande número de sequências de ITS disponíveis em bancos de dados de sequências de nucleotídeos, onde programas computacionais possibilitam a comparação destas sequências de organismos, permitindo definir regiões apropriadas para a síntese de *primers* específicos para cada fungo. Com isso, as regiões ITS vem sendo bastante utilizadas na taxonomia de fungos (LARENA, 1999; FUNGARO, 2001; KAWASAKI *et al.*, 2008; MENEZES *et al.*, 2010) como ferramentas úteis em estudos de filogenia e na diferenciação de espécies (KURAMAE; SOUSA, 2002; NAKAZATO, 2005; STRINGARI, 2009).

Espécies pouco relacionadas e com caracteres morfológicos claramente distintos, apontam resultados claros em análises filogenéticas mesmo quando realizado com base em apenas um *locus* (BRAUN *et al.*, 2003). No entanto, em um Complexo que abriga organismos morfológicamente semelhantes, apenas um *locus* não é considerado suficiente para discriminação de espécies, como aponta estudo realizado por Schubert *et al.* (2007) no complexo *Cladosporium herbarum*, onde uma abordagem utilizando a região ITS, genes para actina, calmodulina, fator de alongamento da tradução 1- α , e histona H3, conduziu a uma árvore com melhor resolução e melhor distinção entre espécies relacionadas (BENSCH *et al.*, 2012).

Bensch *et al.* (2010), com o intuito de esclarecer a diversidade de espécies dentro do complexo *Cladosporium cladosporioides*, além da região ITS, realizaram o sequenciamento parcial do gene para actina e do fator de alongamento da tradução (*tef1*) e observaram que a região ITS possui uma resolução limitada em muitas espécies de *Cladosporium* e os resultados obtidos para as regiões ACT e TEF foram utilizados na comparação da estabilidade do clado. Muitas espécies que fazem parte deste complexo são morfológicamente semelhantes e muitas vezes indistinguíveis apenas com base em dados obtidos de análises morfológicas e, por isso, faz-se necessário o uso de técnicas moleculares para correta identificação.

Nos fungos filamentosos, a actina está localizada na ponta das hifas vegetativas em torno dos núcleos de separação durante a prófase, e formação de septos, o que sugere o importante papel do citoesqueleto de actina no crescimento das hifas e para divisão celular e nuclear (TARKKA *et al.*, 2000). É considerada uma região do citoesqueleto altamente conservada na evolução, codificada por um gene de cópia única. Wirsal *et al.* (2002), em estudo filogenético de *Cladosporium* com base no gene actina, obtiveram uma melhor resolução, levando a uma maior diferenciação nos ramos terminais quando comparado com a árvore de ITS.

O fator de alongamento da tradução (*tef1*) é um membro altamente conservado da família das GTPases, que incluem fatores protéicos envolvidos no início do alongamento e término da

tradução (KEELING; INAGAKI, 2004). É uma das proteínas celulares mais abundantes e que possui a importante característica de conservação da sequência a nível de aminoácidos, o que tem sido bastante utilizado em estudos de análise filogenética em fungos (NAKAZATO, 2005). Stringari (2009) ao estudar a sistemática e diversidade genética de isolados de *Guignardia* spp. e *Phyllosticta* sp. concluíram que as regiões ITS e *tef1* são úteis na distinção entre as espécies de *G. citricarpa*, *G. mangiferae*, *P. spinarum*. Em ascomycetes filamentosos, os genes actina e *tef* são considerados fonte potencialmente rica de características para estudos de populações e de especiação (CARBONE; KOHN, 1999).

O sequenciamento parcial de genes para estudos de taxonomia e filogenia tem proporcionado a criação de bancos de dados genéticos gratuitos, que tem como objetivo reunir e fornecer informações genéticas de táxons de todo o mundo, contribuindo para a realização de pesquisas em diversas áreas como taxonomia e sistemática (BUENO-SILVA, 2012). O NCBI (National Center for Biotechnology) é considerado um banco central de informação genômica e conta com uma série de bancos que armazenam dados obtidos de informações biológicas dos organismos como sequências de nucleotídeos e aminoácidos, além de dispor de informações detalhadas sobre taxonomia. Dentre eles, o GenBank (*Genetic Sequence Database*) é considerado o principal banco de dados de sequências genéticas disponíveis para o público, o qual inclui dados de genomas completos e em andamento (NCBI, 2014; SANTOS *et al.*, 2002; 2003).

2.2 SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA

Dados moleculares são essenciais para análises de relações filogenéticas entre os organismos (SMITH; ONION, 1994). A filogenia retrata a história evolutiva de um grupo de organismos descendente de um ancestral em comum e tem como principal objetivo compreender as relações evolutivas entre as espécies, inferindo a história de vida desde sua origem, representando esses dados através de árvores filogenéticas. Essas árvores são consideradas hipóteses das relações evolutivas que demonstram a ordem de separação das espécies, podendo representar a história evolutiva de um pequeno grupo de organismos ou mesmo de grandes linhagens (VIANA, 2007). A princípio, essas árvores se baseavam apenas em dados obtidos de análises morfológicas, o que trazia resultados pouco confiáveis, visto que, espécies que evoluíram de ancestrais distintos poderiam sofrer transformações originando características morfológicas semelhantes. Com o advento da biologia molecular, através do acesso à estrutura de macromoléculas como o DNA, as análises filogenéticas passaram a ter um avanço acelerado (FERNANDES-MATIOLI, 2001; VIANA, 2007). Técnicas como sequenciamento do DNA levaram ao desenvolvimento de medidas para análise de distância genética e de construção de árvores capazes de expressar as diferenças observadas entre os

organismos, sendo assim uma poderosa ferramenta no estudo da história evolutiva dos organismos (VIANA, 2007).

Existem alguns métodos utilizados para reconstrução de árvores filogenéticas a partir de dados moleculares. O modelo de Neighbor-Joining foi proposto por Saitou e Nei (1987) e tem como princípio encontrar pares de bases vizinhos que se unam e minimizem ao máximo o comprimento total dos ramos de uma árvore em cada estágio do agrupamento. A princípio, estas sequências unidas pela menor distância genética são então consideradas como uma só entidade e, em seguida, é feita a busca pelo terminal seguinte que tenha a menor distância genética deste, o procedimento continua até unir todos os terminais à árvore filogenética. Ao final, o comprimento dos ramos e topologia de uma árvore parcimoniosa pode ser obtido rapidamente através deste método (SAITOU; NEI, 1987). Já a Máxima verossimilhança é um método estatístico baseado em evolução molecular, que calcula cada árvore possível que pode ser derivada dos dados selecionados, além de calcular o comprimento dos ramos de cada árvore diferente. Este método estima a probabilidade do quão bem a matriz de caracteres é explicada por árvores filogenéticas. No outro método, o de Máxima parcimônia, a árvore filogenética ideal consiste naquela que apresentar a menor quantidade de mudanças evolutivas necessárias para explicar uma determinada matriz de caracteres, sendo considerada a mais parcimoniosa (PEÑA, 2011).

2.3 O GÊNERO *Cladosporium*

O gênero *Cladosporium* (teleomorfo: *Davidiella*) foi descrito inicialmente por Link em 1816 e seu nome latino de origem grega, quer dizer “esporos em cadeia que formam ramos” (ALONSO, 2012). Este gênero pertence à família Cladosporiaceae do Filo Ascomycota e tem *Cladosporium herbarum* como sua espécie tipo (INDEX FUNGORUM, 2014). Anteriormente, o gênero estava classificado dentro do Filo Deuteromycota, classe Hyphomycetes, ordem Moniliales e família Dematiaceae (OGÓREK *et al.*, 2012) e atualmente, está inserido no Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Dothideomycetes, Subclasse Dothideomycetidae, Ordem Capnodiales e Família Cladosporiaceae (INDEX FUNGORUM, 2014).

Este é considerado um dos maiores gêneros de Hyphomycetes, assim como um dos mais heterogêneos. Prasil e de Hoog (1988), estimaram existir cerca de 540 espécies de *Cladosporium*, mas publicações recentes contam com dados de mais de 772 nomes que abrangem variedades, formas, espécies, subespécies, nomes de herbário (DUGAN *et al.*, 2004). Um trabalho de Bensch *et al.* (2012) é a revisão de monografia mais recente do gênero, onde os autores apresentam uma chave de identificação descrevendo 169 espécies. Esta heterogeneidade, possivelmente está relacionada a definição imprecisa e abrangente deste gênero na literatura, além da grande variabilidade

morfológica apresentada pelas espécies e a ocorrência de algumas espécies em uma grande diversidade de substratos. Todos os tipos de Hyphomycetes dematiáceos, superficialmente semelhantes e caracterizados pela presença de conídios amero/fragmosporos formados em cadeias acropetais tinham sido atribuídos a *Cladosporium*, criando certa dificuldade no estudo deste gênero e sendo considerado pela Comissão Internacional para a Taxonomia de Fungos como um gênero que necessita urgente de revisão (BENSCH *et al.*, 2012).

Autores como De Vries (1952) e David (1997) conduziram um levantamento da história do gênero, já que descrições iniciais foram consideradas vagas e imprecisas (CORDA, 1837; FRIES, 1832). Esta pesquisa foi fundamental para dar início a revisões a respeito de *Cladosporium*, tendo as primeiras tentativas iniciadas por Crous *et al.* (2001). Em 2003, Braun realizou as primeiras análises moleculares em *Cladosporium* s. lat. e confirmou a forte heterogeneidade do gênero. Além disso, alguns autores publicaram revisões recentes sobre *Cladosporium herbarum* s. lat. (SCHUBERT *et al.*, 2007), *C. sphaerospermum* s. lat. (ZALAR *et al.*, 2007, DUGAN *et al.*, 2008) e *C. cladosporioides* s. lat. (Bensch, *et al.* 2010), demonstrando claramente que estes devem ser considerados como complexos heterogêneos, do qual fazem parte uma grande diversidade de espécies morfologicamente e geneticamente distintas (BENSCH *et al.*, 2012).

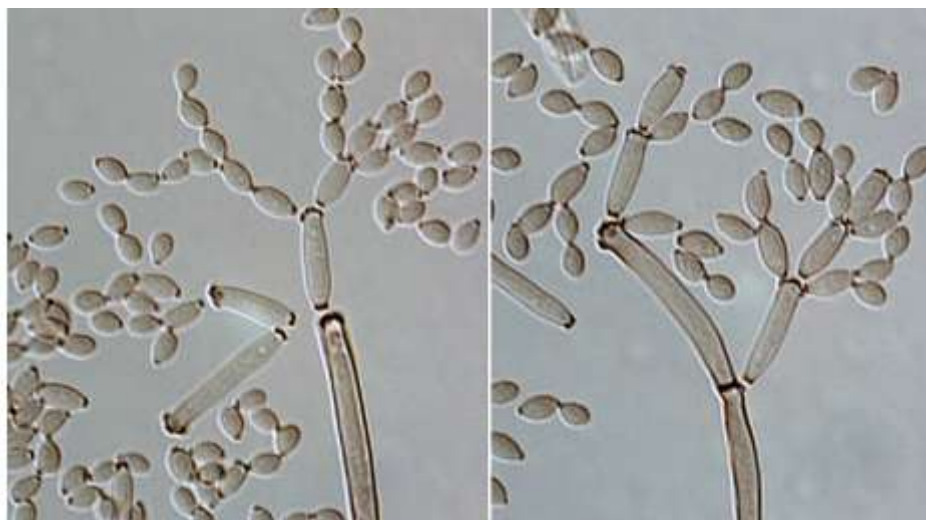
Estes fungos são normalmente encontrados na fase conidial, enquanto seu estágio sexual (*Davidiella* Crous e U. Brau) é raramente formado (OGÓREK *et al.*, 2012) tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Por exemplo, Bensch *et al.* (2010), não conseguiram induzir a formação do teleomorfo em estudo realizado dentro do complexo *C. cladosporioides*. Estes anamorfos crescem moderadamente rápido e caracterizam-se pela produção de colônias puntiformes a efusas, de coloração variando do marrom-oliváceo a cinza-oliváceo de reverso preto e consistência aveludada, flocosa ou de aspecto viloso. *In vivo*, o micélio de *Cladosporium* spp. é constantemente interno mas pode ser interno ou externo e apresenta hifas de paredes finas e pigmentação levemente amarronzada, constantemente septadas. A parede dessas hifas pode se tornar um pouco mais espessa devido a idade, mas estas características da hifa normalmente não possuem muito valor taxonômico (BENSCH *et al.*, 2012; OGÓREK *et al.*, 2012).

Os conidióforos do gênero *Cladosporium* possuem forma cilíndrica, subcilíndrica ou filiforme e são geralmente macronematosos, podendo ser micronematosos em alguns casos, solitários, normalmente retos ou flexuosos, ramificados ou não, apresentando paredes contínuas ou septadas. A ocorrência e o número de septos podem depender do comprimento do conidióforo, o qual varia de acordo com as condições de incubação ou cultivo, *in vitro*. Já a largura dos conidióforos, geralmente, possui pouca variação. As células conidiogênicas são usualmente terminais, integradas ou intercalares, apresentando forma cilíndrica e com cicatrizes, algumas vezes podem ser formadas a partir da diferenciação do conidióforo. O crescimento simpodial dos

conidióforos com prolongamento regular pode dar origem a novas células conidiogênicas, como ocorre em *C. herbarum*. Já em espécies como *C. cladosporioides* e *C. tenuissimum* normalmente não há crescimento simpodial de conidióforos e sem prolongamentos, assim, ocorrendo pouca formação de células conidiogênicas (MENEZES, 2010; BENSCH, *et al.*, 2012).

Todas as espécies do gênero *Cladosporium* são caracterizadas pela produção de conídios em cadeias acropetais que podem ser simpodiais ou, frequentemente, ramificadas. Estes conídios possuem forma altamente variável, septados ou asseptados, podendo ser cilíndricos, ovóides, fusiformes, limoniformes ou elipsóides e formados em cadeia ou solitários, o que é uma característica útil na diferenciação de algumas espécies, mas não possui o mesmo valor na diferenciação a nível de gênero. Dentro das cadeias de conídios eles podem variar de tamanho e forma da base ao ápice, apresentando conídios intercalares muito pequenos e conídios terminais ainda menores e sem septos (MENEZES, 2010; BENSCH *et al.*, 2012). Em *C. cladosporioides* estes conídios podem variar de 4 a 8 μm , sendo asseptados ou com apenas um septo em colônias *in vivo* e de 3 a 6 μm , asseptados em colônias *in vitro*. A espécie *C. tenuissimum* apresenta conídios variando de 3 a 10 μm com 0-1 septo nas colônias *in vivo* e 2.5 a 5 μm , *in vitro* (BENSCH *et al.*, 2012).

Figura 2 - Conídios e conidióforos de *Cladosporium cladosporioides*



Fonte: Bensch *et al.* (2010)

Figura 3. Conídios e conidióforos de *Cladosporium tenuissimum*

Fonte: Bensch *et al.* (2010)

Cladosporium possui distribuição cosmopolita e algumas de suas espécies estão entre os micro-organismos mais comuns encontrados na terra (DUGAN *et al.*, 2004), podendo ser isolados tanto do ar como de diversos outros substratos (ALONSO, 2012). Comumente encontrados em todos os tipos de plantas, outros fungos e detritos, são frequentemente isolados do solo, alimentos, tintas e matérias orgânicas, assim como, são bastante relatados como endofíticos (RIESEN; SIEBER 1985, BROWN *et al.*, 1998, EL-MORSY, 2000, NASCIMENTO *et al.*, 2015). Aldana *et al.* (2013), realizaram estudo sobre a relação entre fungos endofíticos e esporos presentes no ar e relataram *Cladosporium* como o fungo endofítico mais frequente em gramíneas, estando presente também em quantidades elevadas no ar atmosférico. Além disso, espécies do gênero podem atuar como invasores secundários em lesões de plantas causadas por fungos fitopatogênicos (ELLIS 1971, 1976), ocorrendo também como hiperparasitas em outros fungos (HEUCHERT *et al.*, 2005). São considerados importantes agentes na decomposição, deterioração e causadores de alergias no homem e doenças em animais e plantas (ALCANTARA, 2012; VALENZUELA, 2001; ITAKO, 2009; BERNARDI, 2005), tornando-se de grande interesse para pesquisadores em uma ampla variedade de áreas.

Devido a essa produção de conídios muito pequenos que geralmente são formados em cadeias ramificadas, estes são muito bem adaptados para dispersão em grande número por longas distâncias (BENSCH *et al.*, 2012). Sendo assim, estes esporos são relatados por alguns autores como o componente fúngico mais comum encontrado no ar e frequentemente associados a alergias pulmonares (FARR *et al.*, 1989; MULLINS, 2000; HOOG *et al.*, 2000; FLANNIGAN, 2001). Zoppas *et al.* (2011), avaliaram num período de dois anos a distribuição de esporos de

Cladosporium spp. no ar atmosférico da cidade de Caxias do Sul-RS e verificaram uma maior e constante incidência de esporos deste fungo em relação aos outros. Infante *et al.* (1999), conduziram um estudo comparativo da incidência de conídios deste fungo no ar de 5 cidades espanholas e concluíram que *Cladosporium* esteve presente durante todo o ano entre 1993 e 1998 nas 5 cidades avaliadas.

A presença constante desses esporos no ar justifica a capacidade deste fungo em desencadear diversas doenças respiratórias e processos alérgicos. Em grandes quantidades podem afetar gravemente pessoas asmáticas ou que já apresentam problemas respiratórios (INFANTE, 1999; MENEZES, 2012). Resano *et al.* (1998), realizaram um estudo sobre a sensibilização de pacientes asmáticos ao gênero e consideraram *Cladosporium* como um dos aeroalérgenos fúngicos mais importantes, assim como, Sharpe *et al.* (2014), verificaram uma alta incidência de esporos de *Cladosporium*, juntamente com o de outros fungos, ao estudarem a relação da diversidade de fungos presentes no ar dentro de casa e a asma e observaram a associação de esporos do gênero com o aumento do risco de apresentar sintomas de asma.

Além disso, várias espécies de *Cladosporium* têm sido relatadas com capacidade de produzir biomoléculas de interesse econômico (FILHO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011) como, por exemplo, na produção de enzimas extracelulares como a lipase, celulase e protease (BARBOSA *et al.*, 2001), inulinase (SOUZA-MOTTA *et al.*, 2003) produção de fenoloxidasas, peroxidases, lacase (CLAUS; FILIP, 1998; DONNISON *et al.*, 2000), assim como, envolvidos na degradação de hidrocarbonetos (DOBOS; PUJA, 2011). Bastos (2012) em estudo sobre a otimização das condições de cultivo do fungo *C. cladosporioides* na produção de pectinases, verificou uma alta taxa de produção desta enzima pelo fungo, apresentando grande potencial para ser utilizado na indústria alimentícia.

2.3.1. Complexo *Cladosporium cladosporioides*

Em 1952, De Vries discutiu o fato de *C. cladosporioides* ser considerado uma forma de *C. herbarum* e comparou essas duas espécies. O pesquisador observou algumas diferenças morfológicas como uma maior ramificação da cadeia de conídios, sendo menores, lisos e em maiores quantidades na cadeia, e a presença de conidióforos sem prolongamentos em *C. cladosporioides*, o que foi suficiente para considerá-lo como um táxon a parte. Nas últimas décadas, o nome *C. cladosporioides* esteve associado a vários táxons que hoje são considerados distintos, fato que levou a necessidade de uma revisão destes fungos inicialmente classificados com este nome com a finalidade de esclarecer o status taxonômico destes (BENSCH *et al.*, 2010). Por exemplo, em estudo realizado por Bensch *et al.* (2010), uma análise multiloco do DNA (ITS, actina, fator de alongamento da tradução 1- α) complementada com análises morfológicas, foi realizado

com o intuito de elucidar a diversidade de espécies dentro do complexo *C. cladosporioides*, definindo este como um complexo intrincado, do qual fazem parte muitas espécies sapróbias e fitopatogênicas. Esses autores delimitaram alguns caracteres fenotípicos como forma, largura, comprimento, septação de conídios e conidióforos, comprimento e padrões de ramificação das cadeias de conídios e forma de hifas, largura e arranjo como sendo as mais importantes na distinção de espécies dentro do complexo, mas muitas foram consideradas morfológicamente idênticas e distinguidas apenas através da combinação de dados morfológicos, biométricos e moleculares. Com isso, concluíram que atualmente 39 espécies fazem parte deste complexo, dentre elas, as espécies *Cladosporium cladosporioides* e *C. tenuissimum*.

2.3.1.1 *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries

Cladosporium cladosporioides é uma das espécies de fungos mais comuns, de ocorrência registrada em diversas partes do mundo. Algumas características distintivas auxiliam na identificação desta espécie, tais como, a presença de conidióforos sem nódulos e conídios sem septos ou com apenas um, com cicatriz proeminente e, principalmente, por apresentarem conídios de forma elipsoidal ou limoniforme, além de colônias com textura aveludada e coloração variando de verde-oliva a marrom-esverdeado (SAMSON *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2005). Este fungo já foi relatado em associação ao material vegetal em decomposição, como invasor secundário em folhas vivas, isolados do ar, solo, alimentos, entre outros (BENSCH *et al.*, 2012). Geralmente estão relacionados com infecções cutâneas, oculares e nasais (VAILLANT, 1996).

Em trabalhos realizados por Bezerra *et al.* (2012, 2013) isolando micro-organismos endofíticos das cactáceas *Opuntia fícus-indica* e *Cereus jamacaru* os autores relataram *C. cladosporioides* como uma das espécies de fungo mais comumente encontradas. Além disso, este fungo tem sido frequentemente associado a cafés de boa qualidade, o que tem estimulado interesse em relação ao uso de *C. cladosporioides* como agente antagonista a fungos que comprometem a qualidade do café (PEREIRA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004). Provavelmente o mecanismo de ação de *Cladosporium* seria o consumo rápido da mucilagem presente no fruto do café, impedindo ou amenizando o estabelecimento de outros fungos (PEREIRA *et al.*, 2002).

Em plantações, *C. cladosporioides* é produzido em baixa escala no combate a pulgões (FARIA; MAGALHÃES, 2001). Devido ao seu potencial no controle biológico de insetos e de fungos produtores de toxinas em grãos de café, Oliveira *et al.* (2004) identificaram e quantificaram a distribuição desse fungo em amostras de solo, em frutos do café na árvore e em diferentes etapas do processo de pós-colheita nas regiões produtoras de *Coffea arabica* do estado da Bahia e obtiveram como resultado uma maior ocorrência desse fungo na região oeste do estado, sendo encontrado em 100% das amostras de solo analisadas.

Na biotecnologia, o fungo *C. Cladosporioides* também tem sido mencionado como um bom produtor da enzima L-asparaginase, bastante utilizada como um agente antineoplásico no tratamento contra o câncer, e de taxol, que é outro importante agente antitumoral (SARQUIS *et al.*, 2004; ALI *et al.*, 1993, ZHANG *et al.*, 2009). Além disso, são bastante relatados como produtores de enzimas de grande interesse industrial como as proteases, amilases, inulinases e celulasas (SOUZA-MOTTA *et al.*, 2003, SILVA *et al.*, 2011).

2.3.1.2 *Cladosporium tenuissimum* Cooke

Cladosporium tenuissimum é um hifomiceto dematiáceo, saprófito, que ocorre especialmente em áreas tropicais e é encontrado em uma ampla gama de substratos, como na superfície das plantas, no solo, no ar, pão, madeira e também já foi relatado como fungo endofítico (ELLIS, 1976, MOREIRA, 2013). É um colonizador frequente do material vegetal morto e, além da superfície, é comumente encontrado na rizosfera de espécies vegetais (FISHER; PETRINI, 1992).

Assante *et al.* (2004), estudaram o controle biológico do fitopatógeno *Uromyces appendiculares*, causador da ferrugem do feijão, através do micoparasitismo por *C. tenuissimum*. Este cresce dentro do esporo de *U. appendiculares*, preenchendo seu interior com micélio e emergindo do esporo, formando conidióforos e conídios. Batta (2004) descreveu o primeiro caso de infecção de *C. tenuissimum* em frutos de pepino, mas outros estudos também mencionaram esta espécie como patógeno oportunista em outras culturas como tomate, banana e melancia (NARAIN; ROUT, 1981; PANDEY; GUPTA, 1983; NARAIN *et al.*, 1985). Além disso, Fujii *et al.* (1995), relataram *C. tenuissimum* como produtor de lactona responsável por inibir o crescimento de algumas plantas.

A espécie *C. tenuissimum* é comumente confundida e comparada com *C. cladosporioides* por apresentar características morfológicas muito semelhantes, mas um estudo mais detalhado realizado por Bensch *et al.* (2010) mostrou que estas são duas espécies morfológica e geneticamente distintas. Esta apresenta, *in vitro*, conidióforos solitários, macronematosos e micronematosos subnoduloso ou noduloso, conídios sem septos ou com apenas um de formato globoso, subgloboso, limoniforme e colônias variando de cinza oliváceo a oliva acinzentado.

2.4 COLEÇÕES DE CULTURAS

Coleções de cultura são centros de conservação de micro-organismos e importante fonte de recursos biológicos. Estas tem como função manter e preservar culturas relevantes para estudos científicos e aplicações biotecnológicas, tornando-os disponíveis para os usuários interessados, contribuindo assim para estudos da sistemática e biodiversidade mundial, além de permitir a

condução de trabalhos científicos, principalmente na área da biotecnologia (ABREU; TUTUNJI, 2003; SOUZA-MOTTA, 2012). Geralmente em estudos de revisões e atualizações taxonômicas de fungos, as culturas utilizadas estão preservadas nesses centros.

A World Federation for Culture Collections (WFCC) conta com cerca de 650 coleções cadastradas no World Data Center for Microorganisms (WDCM). No Brasil, existem 43 núcleos de pesquisa registrados no WDCM, onde estima-se a manutenção de mais de um milhão de amostras, representadas por 44% de fungos, 43% bactérias, 2% vírus, 1% células vivas e 10% espécimes como plasmídeos, plantas, células animais e algas, contudo, apenas 16 destes centros fornecem material para usuários de outras instituições.

2.4.1 Micoteca URM

Fundada em 1954 pelo Prof. Augusto Chaves Batista, a Micoteca URM Maria Auxiliadora Cavalcanti é uma coleção brasileira de culturas de fungos, localizada no Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. Recentemente, a Micoteca se tornou a primeira coleção de micro-organismos da América do Sul com o Sistema de Gerenciamento da Qualidade baseado na ISO 9001:2008. Encontra-se registrada no Commonwealth Mycological Institute (CMI) sob a sigla URM (University Recife Mycologia) e é filiada ao World Federation for Culture Collections (WFCC) sob o N° 604. Das 653 coleções de 70 países cadastradas no WFCC, foi a 27ª a receber um selo de qualidade.

Atualmente, o acervo da Micoteca possui um total de cerca de 25 mil cepas de fungos, representado por uma grande diversidade de fungos pertencente aos filos Zygomycota (hoje conhecido como Mucoromycotina), Ascomycota e Basidiomycota. Todas essas culturas estão disponíveis para a comunidade científica e outros interessados e encontram-se mantidas em duplicata e identificadas a nível de espécie, preservadas por pelo menos dois métodos. Além de contar com o recebimento de amostras de fungos para compor o acervo, a Micoteca URM presta serviços para pesquisadores e indústrias de setores privados, atendendo a pedidos de fornecimento de amostras, isolamento e identificação de culturas, preservando a biodiversidade de fungos coletados, além de promover o treinamento de estudantes e profissionais na área de taxonomia e preservação, oferecendo também cursos de extensão. (MICOTECA, 2014).

Os métodos de preservação utilizados em coleções de culturas devem ser adequados para fornecer uma análise fenotípica e genotípica satisfatória das culturas armazenadas a longo prazo. Estes devem assegurar a manutenção da viabilidade, estabilidade e pureza das culturas, conservando ao máximo suas propriedades morfo/fisiológicas, impedindo ou minimizando a ocorrência de mutações que alterem suas características (ABREU; TUTUNJI, 2003; SOLA, 2012). A escolha do

método adequado depende da espécie de interesse, dos recursos disponíveis e do objetivo. Algumas das técnicas usualmente empregadas para manutenção de micro-organismos são repiques seriados, preservação em óleo mineral, sílica gel, solo, água destilada e esterilizada, liofilização, nitrogênio líquido, ultracongelamento a -80°C (SOUZA-MOTTA, 2012; NAKASONE *et al.*, 2004). As amostras utilizadas neste estudo estão preservadas na Micoteca URM pelos métodos de imersão em óleo mineral e liofilização.

2.4.1.1 Imersão em óleo mineral

Técnica simples e de fácil manutenção, a preservação em óleo mineral pode garantir a manutenção de culturas por vários anos sob temperaturas de $5 - 20^{\circ}\text{C}$. Este método conta com a aplicação de uma camada de óleo esterilizado sobre as culturas, deixando-as submersas por cerca de 1 cm, com o intuito de diminuir a quantidade de oxigênio disponível e, assim, reduzir a atividade metabólica dos microorganismos com conseqüente redução da taxa de multiplicação. Essa quantidade de óleo presente nos tubos deve ser verificada periodicamente, adicionado mais, se necessário, para garantir que toda a cultura esteja encoberta. Autores afirmam que esta quantidade de óleo não deve ultrapassar os 10 mm, visto que, limita completamente o fornecimento de oxigênio, inviabilizando as culturas (NAKASONE *et al.*, 2004; SOLA *et al.*, 2012).

Girao *et al.* (2004), avaliaram a viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* preservada sob diferentes métodos e observaram a eficiência no uso desta técnica ao concluir que houve uma melhora na viabilidade das estirpes conservadas sob óleo mineral, provavelmente, devido a capacidade de diminuir o metabolismo dos fungos e prevenir a desidratação do meio.

Apesar da redução na atividade metabólica dos microorganismos armazenados, estes continuam a crescer, podendo haver a seleção de mutantes sob condições adversas, o que é apontado como uma desvantagem desse método. Além da possibilidade de contaminação durante os repiques e dificuldades com o manuseio e esterilização do óleo (NAKASONE *et al.*, 2004; SOLA *et al.*, 2012).

A recuperação de culturas mantidas sob conservação em óleo é feita através da transferência de um fragmento do fungo para tubo com meio de cultura adequado. Nakasone *et al.* (2004) sugerem que nessa transferência haja a drenagem total da camada de óleo e, se necessário, seja realizado mais de um repique para garantir que a nova cultura esteja totalmente livre de óleo. Sendo assim, esta técnica se apresenta tão vantajosa quanto os repiques seriados, permitindo um tempo ainda maior de conservação, assegurando a sobrevivência de fungos filamentos por um período de 1 até 5 anos (ABREU; TUTUNJI, 2003; SOLA *et al.*, 2012).

2.4.1.2 Liofilização

Considerado um método de preservação a longo prazo, é caracterizado pela desidratação das células ou esporos viáveis por congelamento e a vácuo. Esta consiste na suspensão de esporos em uma solução protetora que pode ser leite desnatado, glicose, sacarose, soro bovino, em seguida, esse material é então distribuído em papel filtro no interior de ampolas de vidro onde serão submetidas a rápido congelamento sob condições de vácuo e temperatura de -40°C a -50°C (PASSADOR, 2010; GUIMARÃES, 2011; SOLA *et al.*, 2012).

Este processo de liofilização não é apropriado para todos os fungos. Recomenda-se a seleção de fungos que produzem esporos de cerca de 10 mm ou menos de diâmetro e em grandes quantidades, pois esporos maiores tendem a colapsar durante o processo de liofilização, causando danos estruturais irreversíveis. Muitos esporos de tamanho apropriado também podem sofrer danos no congelamento pela formação de cristais de gelo, assim, é recomendado que cada ampola contenha uma boa quantidade de esporos viáveis (NAKASONE *et al.*, 2004).

Apesar do custo na preparação das amostras e uso de equipamentos onerosos para desidratação do material, este método fornece algumas vantagens como baixa taxa de mutações e contaminação, alta estabilidade das culturas pela diminuição na variação das linhagens devido ao raro manuseio, além de não requerer muito espaço para armazenamento (PASSADOR, 2010; GUIMARÃES, 2011; SOLA *et al.*, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CULTURAS DE FUNGOS

Foram utilizadas 40 culturas pertencentes a duas espécies do gênero *Cladosporium* (*C. cladosporioides* e *C. tenuissimum*) preservadas na Micoteca URM Maria Auxiliadora Calvalcanti da Universidade Federal de Pernambuco, sob os métodos de imersão em óleo mineral e liofilização (Tabela 1).

Tabela 1 - Culturas de fungos do gênero *Cladosporium* depositadas na Micoteca URM da UFPE

Espécie	Nº de registro	Ano de depósito	Substrato
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM6703	2012	Derme-músculo-esquelético
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM6511	2012	Endofítico
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM6502	2011	Solo de Sistema Agroflorestal
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM6246	2010	Solo de Mata Atlântica
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM6119	2009	Ar
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM6084	2009	<i>Calotropis procera</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM5843	2008	Solo
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM5737	2008	Água

<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM5736	2008	Água
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM5448	2007	Solo
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM5379	2006	Água
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM5349	2006	<i>Borreria verticillata</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM5236	2006	Cavidade oral do sagüi
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM4837	2004	Jardim de fungo de saúva
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM4693	2003	Solo
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM4465	2002	Solo de praia
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM4168	1999	Rizosfera de Girassol
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM4096	-	Solo
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM4030	1998	Folha
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM3865	1997	Resíduo de acerola
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM3752	1997	Solo
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM3654	1996	Lesão cariosa
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM3503	1994	Rizosfera
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM3436	1994	Aveia beneficiada
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM3386	1994	Aveia beneficiada
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM3204	1990	Cromomicose
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM3175	1990	Óleo de Babaçú
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM3107	1989	Folha
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM3101	1989	Folha
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM3080	1989	Cola plástica
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM2830	1985	<i>Dioscorea sp.</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	URM2567	1980	<i>Psidium guajava</i>
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	URM5632	2007	Sementes de mamona
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	URM4686	2003	Goma de Mandioca
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	URM4032	1998	Casca de árvore
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	URM3721	1996	Água
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	URM3387	1994	Aveia beneficiada
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	URM3176	1990	Óleo de Babaçú
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	URM2972	1988	Solo marinho
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	URM2942	1988	Rizosfera de tomate

3.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Para análise das características macroscópicas das colônias, as culturas foram cultivadas em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar), MEA (Ágar Extrato de Malte), SNA (Ágar Synthetic Nutrient-poor) e AO (Ágar Aveia) através de inóculo central e incubadas por 14 dias a

25°C no escuro; em seguida, foi mensurado o diâmetro das colônias e avaliadas a superfície e cores do verso e reverso.

As características microscópicas foram observadas em microscopia de luz a partir de culturas de *Cladosporium* cultivadas em meio de cultura SNA e BDA. Um cubo de cada meio de cultura foi colocado sobre uma lâmina contida em placa de Petri esterilizada, onde o fungo foi repicado nos quatro lados do cubo de Ágar e, em seguida, recoberto com uma lamínula e mantidos por 7 dias à 25°C sob UVA contínua. Uma porção de algodão embebido em água destilada esterilizada foi colocada dentro da placa a fim de evitar a dessecação do meio de cultura durante o crescimento fúngico. Após o crescimento, as lamínulas foram retiradas e colocadas sobre uma nova lâmina contendo ácido láctico (85-90%), analisadas e mensuradas aproximadamente 30 estruturas de cada fungo entre conídios, conidióforos e ramoconídios e, em seguida, fotografadas.

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Sequências parciais de genes foram determinadas como descrito por Crous *et al.* (2006) e Schubert *et al.* (2007) para a actina (ACT), fator de alongamento da tradução 1- α (TEF), e parte do rDNA operon nuclear que mede a extremidade 3' do gene 18S rRNA, o primeiro espaçador interno transcrito, o gene 5.8S rRNA, o segundo espaçador interno transcrito e a extremidade 5' do gene de rRNA 28S (ITS). A extração e amplificação de fragmentos do DNA foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Micologia, CCB, UFPE.

3.3.1 Obtenção do micélio e extração do DNA

A biomassa dos isolados foi obtida a partir dos cultivos realizados em meio de cultura extrato de malte (MEA) líquido contido em frascos de Erlenmeyer e mantidos a temperatura ambiente por até sete dias. Em seguida, todo micélio foi retirado do frasco de Erlenmeyer com o auxílio de uma alça de platina, sendo o material transferido para microtubos de 2 ml com tampa de rosca, acrescidos de 0,5g de contas de vidro (glass beads) com dois diâmetros diferentes na proporção de 1:1 (acid-washed, 150-212 μ m and 425-600 μ m; Sigma, U.S. sieve). O material foi então triturado por agitação em alta velocidade em um FastPrep. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o kit de extração UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc., Solana Beach, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante.

3.3.2 Amplificação e sequenciamento das regiões ITS do rDNA, ACT (actina) e do fator de alongamento da tradução *tef1*

A região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foi amplificada utilizando os *primers* ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'),

segundo White *et al.* (1990). A amplificação parcial do gene da actina foi realizada utilizando o par de primers ACT 512F (ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC) e ACT 783R (TACGAGTCCTTCTGGCCCAT). Para amplificação do fator de alongamento da tradução (*tef1*) foram usados os primers EF1-728F (CATCGAGAAGTTCGAGAAGG) e EF1-986R (TACTTGAAGGAACCCTTACC) (O'DONNELL *et al.* 1998). As reações de PCR foram realizadas em Termociclador Axygen num volume total de solução de 25µl contendo 2,5µl de Tampão da taq (10x), 0,2µl de MgCL₂ (25µM), 0,5 de dNTP (10mM), 2µl de cada primer (5mM), 0,2µl de Taq polimerase (5U/µl), 12,6µl de H₂O miliQ, 5µl de DNA (5ng/µl) e as condições de amplificação foram definidas com uma desnaturação inicial de temperatura de 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de temperatura de desnaturação de 94°C durante 45 segundos, hibridação do primer a 48°C (52°C durante TEF e ACT) durante 30 segundos, a extensão do primer a 72°C durante 90 segundos e uma etapa de extensão final a 72°C durante 6 minutos.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com GelRed® e visualizados sob luz UV utilizando-se marcador de peso molecular 1kb plus. Os produtos obtidos da amplificação foram purificados utilizando o “PureLink PCR Purification Kit” (Invitrogen®) e encaminhados para Plataforma de Sequenciamento do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas da UFPE.

3.3.3 Alinhamento das sequências e análise filogenética

Os cromatogramas do sequenciamento foram analisados para auxiliar na edição manual das sequências. Após a edição, todas as sequências foram utilizadas para busca das mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn (Básic Local Alignment Search Tool). As sequências experimentais foram então alinhadas em conjunto com as recuperadas da base de dados utilizando o programa Clustal X (LARKIN *et al.*, 2007). Os alinhamentos foram posteriormente editados manualmente, utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Árvores filogenéticas foram construídas através do método de neighbor joining (NJ), máxima verossimilhança (MV) e máxima parcimônia (MP), com 5000 reamostragens de *bootstrap* utilizando o programa PAUP versão 4 (SWOFFORD, 2003). A construção da árvore por máxima verossimilhança foi realizada usando o modelo de substituição nucleotídica obtido pelo ModelTest 3.7 (POSADA; CRANDALL, 1998). As sequências recuperadas do GenBank para o Complexo *Cladosporium cladosporioides* podem ser visualizadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Número de acesso as sequências de nucleotídeos das espécies do Complexo *Cladosporium cladosporioides* depositadas no GenBank e utilizadas neste estudo. Regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*), TEF (*translation elongation factor 1-alpha*) e ACT (partial actin gene)

Espécie	Nº de acesso à cultura	Nº de acesso no GenBank			Referência
		ITS	TEF	ACT	
<i>C. cladosporioides</i>	CBS 112388	HM148003	HM148244	HM148490	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. tenuissimum</i>	CBS 125995	HM148197	HM148442	HM148687	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. grevilleae</i>	CBS 114271	JF770450	JF770472	JF770473	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. perangustum</i>	CBS 125996	HM148121	HM148365	HM148610	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. flabelliforme</i>	CBS 126345	HM148092	HM148336	HM148581	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. exasperatum</i>	CBS 125986	HM148090	HM148334	HM148579	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. scabrellum</i>	CBS 126358	HM148195	HM148440	HM148685	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. chalastosporioides</i>	CBS 125985	HM148001	HM148242	HM148488	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. hillianum</i>	CBS 125988	HM148097	HM148341	HM148586	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. exile</i>	CBS 125987	HM148091	HM148335	HM148580	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. paracladosporioides</i>	CBS 171.54	HM148120	HM148364	HM148609	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. varians</i>	CBS 126362	HM148224	HM148470	HM148715	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. globisporum</i>	CBS 812.96	HM148096	HM148340	HM148585	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. iranicum</i>	CBS 126346	HM148110	HM148354	HM148599	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. phyllophilum</i>	CBS 125992	HM148154	HM148398	HM148643	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. licheniphilum</i>	CBS 125990	HM148111	HM148355	HM148600	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. phyllactiniicola</i>	CBS 126355	HM148153	HM148397	HM148642	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. asperulatum</i>	CBS 126340	HM147998	HM148239	HM148485	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. myrtacearum</i>	CBS 126350	HM148117	HM148361	HM148606	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. pini-ponderosae</i>	CBS 124456	FJ936160	FJ936164	FJ936167	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. chubutense</i>	CBS 124457	FJ936158	FJ936161	FJ936165	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. colombiae</i>	CBS 274.80B	FJ936159	FJ936163	FJ936166	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. lycoperdinum</i>	CBS 574.78C	HM148115	HM148359	HM148604	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. delicatulum</i>	CBS 126344	HM148081	HM148325	HM148570	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. silenae</i>	CBS 109082	EF679354	EF679429	EF679506	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. acalyphae</i>	CBS 125982	HM147994	HM148235	HM148481	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. inversicolor</i>	CBS 401.80	HM148101	HM148345	JF770473	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. rectoides</i>	CBS 125994	HM148193	HM148438	HM148610	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. xylophilum</i>	CBS 125997	HM148230	JF770472	HM148581	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. angustisporum</i>	CBS 125983	HM147995	HM148365	HM148579	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. cucumerinum</i>	CBS 171.52	HM148072	HM148336	HM148685	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. subuliforme</i>	CBS 126500	HM148196	HM148334	HM148488	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. colocasiae</i>	CBS 386.64	HM148067	HM148440	HM148586	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. funiculosum</i>	CBS 122129	HM148094	HM148242	HM148580	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. pseudocladosporioides</i>	CBS 125993	HM148158	HM148341	HM148609	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. gamsianum</i>	CBS 125989	HM148095	HM148335	HM148715	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. verrucocladosporioides</i>	CBS 126363	HM148226	HM148364	HM148585	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. australiense</i>	CBS 125984	HM147999	HM148470	HM148599	Bensch <i>et al.</i> 2012
<i>C. phaeocomae</i>	CBS 128769	JF499837	HM148340	HM148643	Bensch <i>et al.</i> 2012

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA

Morfológicamente, as 40 culturas de fungos do gênero *Cladosporium* apresentaram, após 14 dias de crescimento em meio de cultura BDA, SNA, OA e MEA a 25°C no escuro, as seguintes características macroscópicas:

4.1.1 *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries

Características da cultura: Em meio de cultura BDA, as colônias de *Cladosporium* variaram de 1,4 a 7,5 cm de diâmetro, apresentando no anverso coloração acinzentada, olivácea, cinza olivácea ou oliva acinzentada. Reverso variando de oliváceo para preto, cinza para preto, oliva ou raramente amarelado, de consistência velutínea para flocosa, apresentando margem regular ou raramente irregular de coloração esbranquiçada, amarelada ou acinzentada. Micélio aéreo muito baixo ou abundantemente formado, podendo ocupar toda a superfície da colônia ou localizado apenas no centro. Normalmente as colônias não apresentaram exsudatos proeminentes (Figura 5). Resultados semelhantes foram encontrados por Bensch *et al.* (2010) ao caracterizar morfológicamente *C. colocasiae*, uma espécie pertencente ao mesmo Complexo *Cladosporium cladosporioides*, que verificaram o crescimento micelial médio de 5-7 cm de diâmetro após 14 dias em meio BDA e coloração também variando de oliva a oliva acinzentado. De acordo com Ogórek *et al.* (2012), espécies de *Cladosporium* crescem moderadamente rápido em meio de cultura BDA a temperatura de 25°C e apresentam as características normalmente observadas para o gênero como a formação de colônias de consistência velutínea e coloração verde olivácea e de reverso preto. Os pesquisadores também observaram que a maioria das espécies não cresce em temperaturas acima de 35°C.

As colônias crescidas em meio de cultura MEA apresentaram diâmetro variando entre 1,8 e 7,9 cm, de coloração acinzentada ou olivácea, muitas vezes oliva acinzentada, branco acinzentada de reverso oliváceo para preto ou cinza para preto. A margem da colônia exibiu forma normalmente regular, podendo ser pouco irregular e de coloração acinzentada, olivácea e esbranquiçada, exibindo consistência velutínea para flocosa. O micélio aéreo foi frequentemente muito baixo, mas podendo ser abundante e ocupando toda colônia, apresentando pouca formação de exsudatos (Figura 6). Ogórek *et al.* (2012) avaliaram o crescimento de *Cladosporium herbarum* em MEA a 20°C após 10 dias e observaram que o diâmetro das colônias variou de 3 a 7 cm exibindo coloração verde oliváceo a marrom oliváceo de consistência velutínea e reverso apresentando coloração oliva para preto.

Colônias em SNA frequentemente hialinas, podendo apresentar coloração olivácea ou amarronzada no centro, variando de 2,3 a 6,8 cm de diâmetro. Verso da colônia hialino, oliváceo ou

amarronzado no centro, de margem regular e, às vezes, muito irregular com micélio aéreo muito baixo, sem formação de exsudatos. Colônias apresentaram consistência velutínea, ocasionalmente flocosa (Figura 7).

Colônias em OA variando de 1,6 a 7,0 cm de diâmetro, cinza chumbo, branco acinzentada, oliva acinzentada ou apenas olivácea. Verso oliva para preto ou cinza para preto. Margem comumente regular, podendo ser pouco irregular e de coloração olivácea e raramente preta. Houve a formação de pouco exsudato em apenas uma colônia e micélio aéreo frequentemente muito baixo ou abundante por toda superfície da colônia, de consistência velutínea para flocosa (Figura 8).

Em estudo realizado com outra espécie do gênero, Menezes (2012) analisou as características macroscópicas de culturas de *Cladosporium carrionii* após um período de 10 a 30 dias em meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose a 28°C e observou a formação de colônias de coloração verde oliva, verde acinzentada ou lavanda e reverso apresentando coloração verde-azeviche.

4.1.2 *Cladosporium tenuissimum* Cooke

Características da cultura: Colônias em BDA variando de 1,5 a 8,0 cm de diâmetro, coloração cinza olivácea ou oliva acinzentada, amarelada ou acinzentada de verso oliva para preto, cinza para preto ou apenas olivácea. Colônias de consistência velutínea para flocosa com micélio aéreo muito baixo e margem regular a pouco irregular de coloração esbranquiçada, apresentando pouco ou muitos exsudatos proeminentes (Figura 5 – I;J). Bensch *et al.* (2012), também analisaram a espécie *C. tenuissimum* crescendo em meio de cultura BDA e observaram o crescimento da colônia de até 8,4 cm de diâmetro após 14 dias, apresentando colônias de coloração cinza olivácea ou olivácea para cinza e reverso cinza chumbo para preto oliváceo, micélio aéreo abundante e alto, sem exsudatos proeminentes.

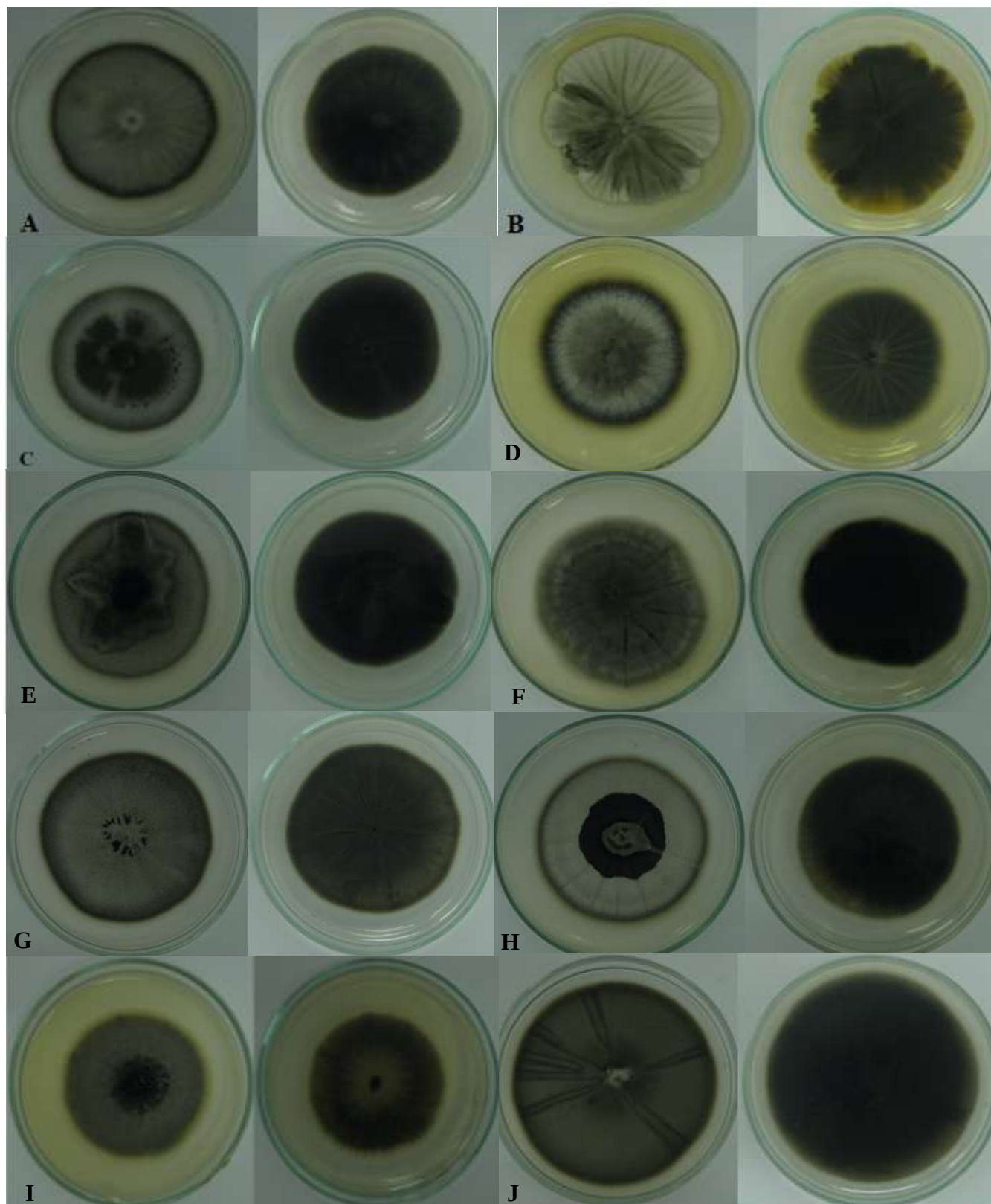
Colônias em MEA apresentaram crescimento micelial de 1,5 a 7,9 cm de diâmetro, cinza olivácea, branco acinzentada ou apenas acinzentada e verso cinza para preto ou oliva para preto. Margem da colônia normalmente regular, podendo ser pouco irregular de coloração esbranquiçada, acinzentada ou olivácea. Consistência frequentemente velutínea, às vezes velutínea para flocosa, micélio aéreo muito baixo e poucas vezes abundante, sem formação de exsudatos (Figura 6 – I;J). Bensch *et al.* (2010) ao analisar macroscopicamente isolados da espécie *C. tenuissimum* verificaram o crescimento das colônias de até 8 cm para os fungos inoculados em MEA após 14 dias de incubação. Oliveira *et al.* (2014) isolaram duas espécies de *Cladosporium* como fungo endofítico pertencentes ao Complexo *Cladosporium sphaerospermum* e caracterizaram morfológicamente.

Cladosporium halotolerans e *C. dominicanum* foram cultivados em MEA por 14 dias a 25°C e apresentaram crescimento médio da colônia de 5,9 cm e coloração verde escura acinzentada amarelada a verde escura e verso verde escuro e 3,4 cm de diâmetro, verde escura, de consistência velutínea e verso cinza escuro, respectivamente.

Colônias em SNA hialinas, podendo apresentar coloração olivácea ou amarronzada no centro, verso oliva para preto ou hialino com centro oliváceo ou amarronzado de margem regular e micélio aéreo muito baixo conferindo a colônia uma consistência velutínea, sem formação de exsudatos, variando de 1,2 a 6,8 cm de diâmetro (Figura 7 – I;J).

Colônias em OA variando de 1,4 a 6,7 cm de diâmetro, com o anverso apresentando coloração olivácea, acinzentada, branco acinzentada e cinza-preto de verso oliva-preto, cinza-preto ou amarronzado. Margem regular a irregular de coloração olivácea, amarelada ou esbranquiçada, micélio aéreo muito baixo e sem formação de exsudatos (Figura 8 – I;J).

Figura 4 - Características macroscópicas de *Cladosporium cladosporioides* em BDA. **A.** URM 2567; **B.** URM 4837; **C.** URM 3386; **D.** URM 3865; **E.** URM 5349; **F.** URM 5448; **G.** URM 6119; **H.** URM 6246. Características macroscópicas de *Cladosporium tenuissimum* em BDA. **I.** URM 4686; **J.** URM 5632



Fonte: Autoria própria

Figura 5 - Características macroscópicas de *Cladosporium cladosporioides* em MEA. **A.** URM 4837; **B.** URM 6246; **C.** URM 4168; **D.** URM 3101; **E.** URM 4096; **F.** URM 5736; **G.** URM 6502; **H.** URM 3386. Características macroscópicas de *Cladosporium tenuissimum*. **I.** URM 5632; **J.** URM 4032

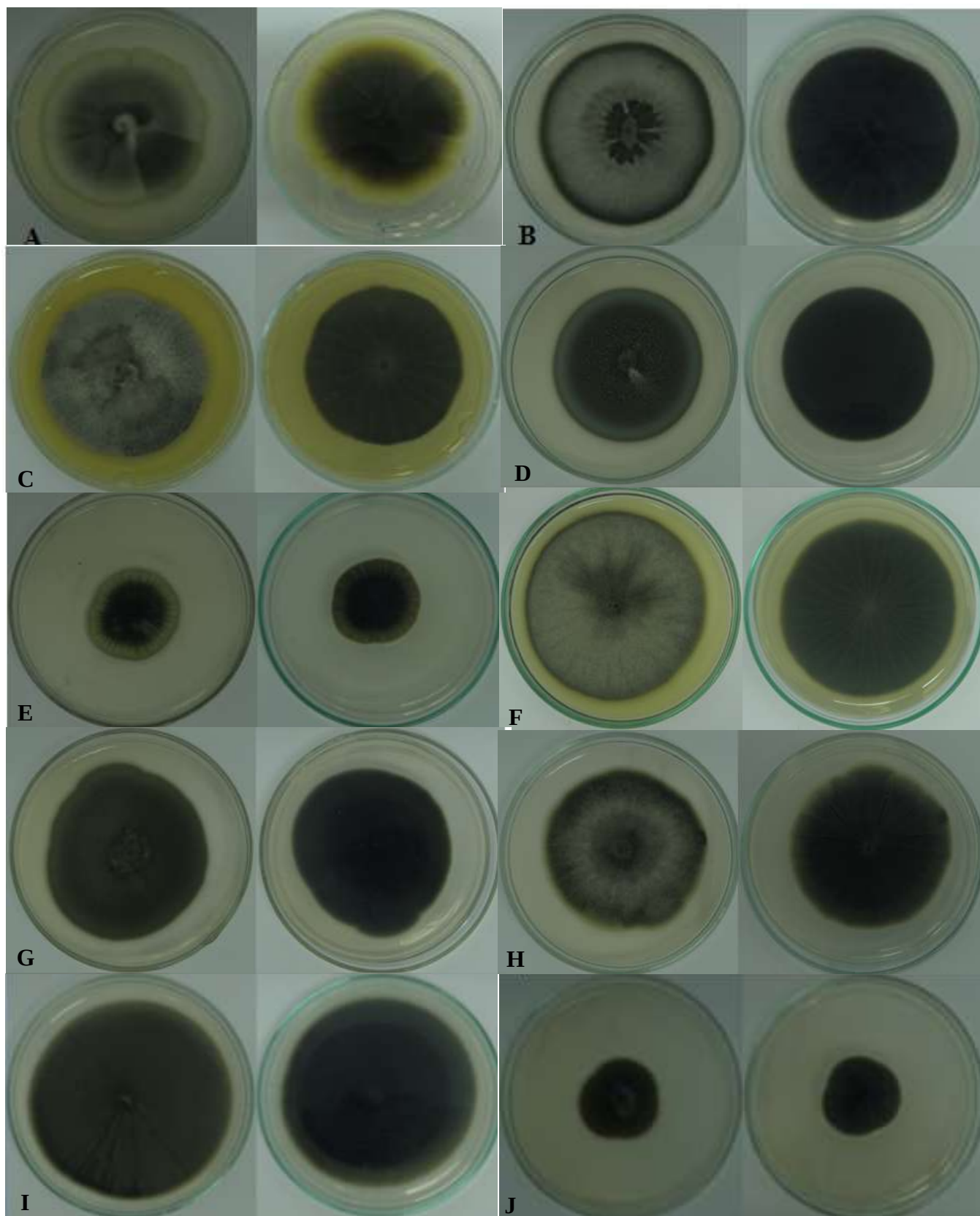
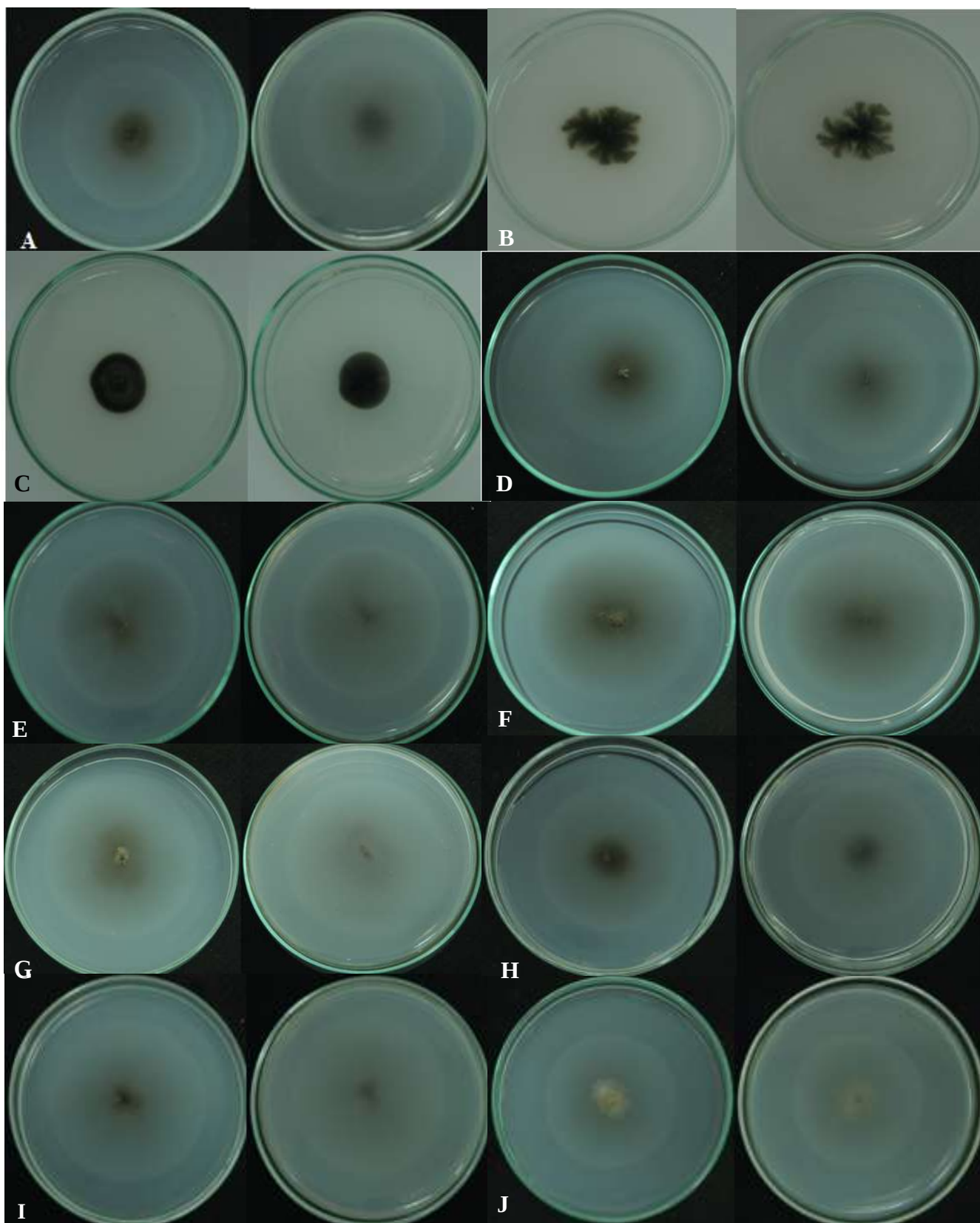
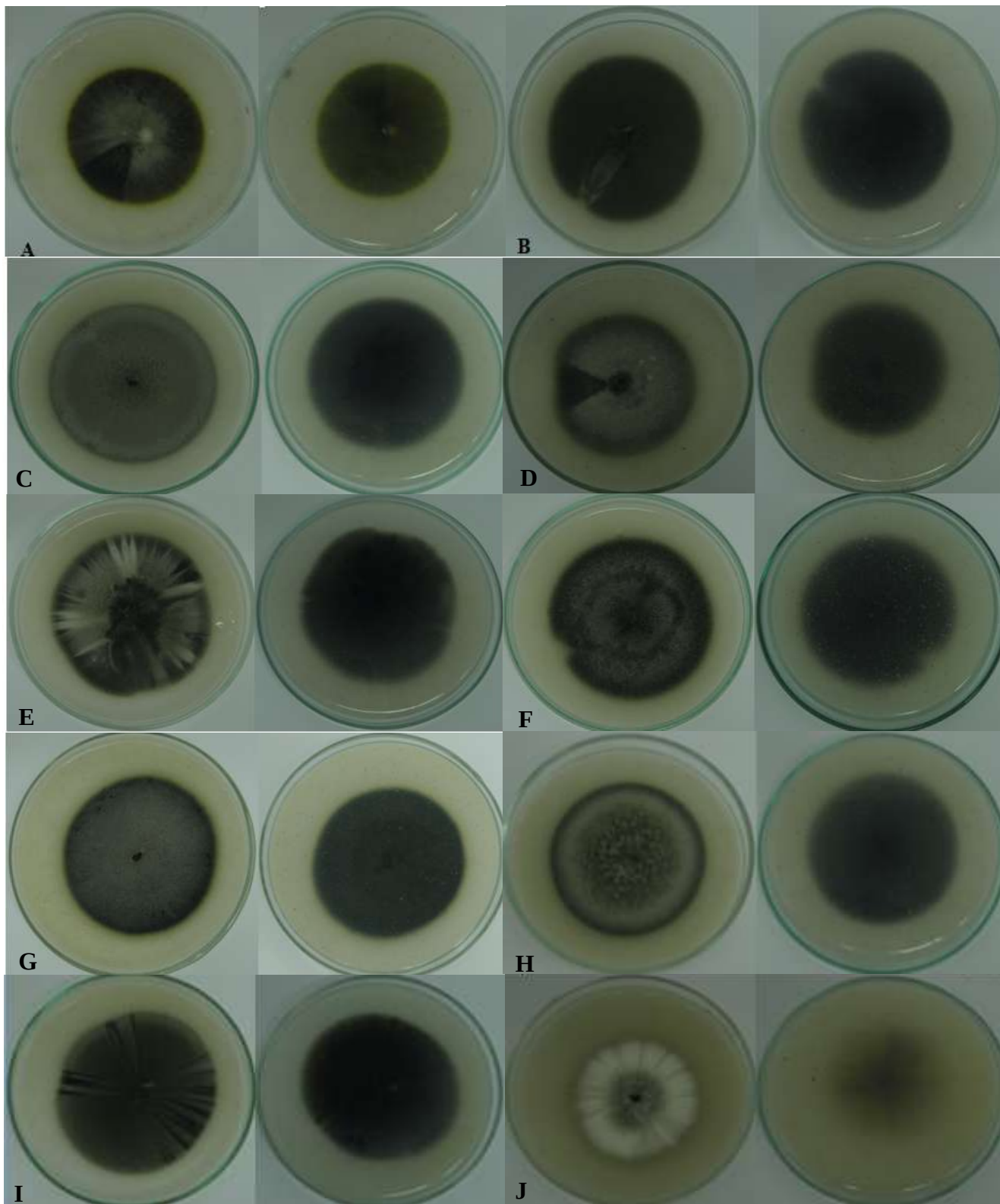


Figura 6 - Características macroscópicas de *Cladosporium cladosporioides* em SNA. **A.** URM 4030; **B.** URM 3175; **C.** URM 3204; **D.** URM 3654; **E.** URM 4168; **F.** URM 5736; **G.** URM 5737; **H.** URM 5843. Características macroscópicas de *Cladosporium tenuissimum*. **I.** URM 4686; **J.** URM 2972



Fonte: Autoria própria

Figura 7 - Características macroscópicas de *Cladosporium cladosporioides* em OA. **A.** URM 4837; **B.** URM 6246; **C.** URM 3101; **D.** URM 3107; **E.** URM 3865; **F.** URM 4168; **G.** URM 5737; **H.** URM 6502. Características macroscópicas de *Cladosporium tenuissimum*. **I.** URM 5632; **J.** URM 3176



Fonte: Autoria própria

Tabela 3 - Características macroscópicas das culturas de *Cladosporium* em meio BDA e MEA

URM	BDA			MEA		
	Diâmetro (cm)	Cor	Textura	Diâmetro (cm)	Cor	Textura
URM 6703	5,7	Cinza/oliva	Velutínea/flocosa	4,9	Cinza/oliva	Velutínea
URM 6511	3,4	Oliva	Velutínea	3,5	Oliva	Velutínea
URM 6502	6,7	Cinza/oliva	Velutínea	6,9	Oliva/cinza	Velutínea/flocosa
URM 6246	6,6	Cinza/oliva	Velutínea	7,9	Acinzentada	Velutínea/flocosa
URM 6119	7,0	Cinza/oliva	Velutínea	7,8	Acinzentada	Velutínea/flocosa
URM 6084	4,7	Oliva/cinza	Velutínea	4,8	Cinza/preto	Velutínea/flocosa
URM 5843	2,2	Cinza chumbo	Velutínea/flocosa	7,0	Acinzentada	Velutínea/flocosa
URM 5737	7,1	Oliva/cinza	Flocosa	6,5	Oliva/cinza	Flocosa
URM 5736	6,7	Oliva/cinza	Flocosa	7,7	Oliva/cinza	Flocosa
URM 5448	6,8	Oliva	Velutínea	7,3	Cinza/oliva	Velutínea
URM 5379	3,3	Cinza/oliva	Velutínea	3,5	Cinza/oliva	Velutínea/flocosa
URM 5349	6,6	Cinza/oliva	Flocosa	7,0	Cinza/oliva	Flocosa
URM 5236	5,9	Cinza/oliva	Flocosa	6,2	Cinza/oliva	Flocosa
URM 4837	7,3	Acinzentada	Velutínea	6,8	Acinzentada	Velutínea
URM 4693	7,5	Branco/cinza	Velutínea	7,5	Acinzentada	Flocosa
URM 4465	4,8	Oliva/cinza	Velutínea	5,5	Oliva	Velutínea
URM 4168	7,3	Acinzentada	Velutínea/flocosa	7,0	Acinzentada	Flocosa
URM 4096	3,7	Oliva/cinza	Velutínea/flocosa	3,8	Oliva	Velutínea
URM 4030	4,5	Oliva/cinza	Velutínea/flocosa	6,5	Oliva/cinza	Velutínea/flocosa
URM 3865	7,0	Oliva/cinza	Velutínea/flocosa	7,8	Cinza/oliva	Flocosa
URM 3752	5,3	Acinzentada	Flocosa	3,5	Oliva/cinza	Velutínea
URM 3654	6,5	Oliva/cinza	Velutínea/flocosa	7,7	Oliva/cinza	Flocosa
URM 3503	3,2	Amarronzada	Flocosa	3,0	Acinzentada	Flocosa
URM 3436	5,1	Oliva/preto	Velutínea/flocosa	5,5	Oliva/cinza	Velutínea/flocosa
URM 3386	6,5	Cinza/oliva	Flocosa	6,8	Acinzentada	Flocosa
URM 3204	1,5	Cinza chumbo	Velutínea	1,8	Oliva/cinza	Velutínea
URM 3175	2,0	Oliva	Velutínea	2,7	Oliva/cinza	Velutínea
URM 3107	1,4	Oliva/cinza	Velutínea	4,3	Cinza/oliva	Velutínea
URM 3101	7,3	Cinza/oliva	Velutínea	6,2	Cinza/oliva	Velutínea
URM 3080	4,1	Oliva/cinza	Velutínea	4,1	Acinzentada	Velutínea/flocosa
URM 2830	6,8	Cinza/oliva	Velutínea/flocosa	6,5	Oliva	Velutínea/flocosa
URM 2567	6,7	Cinza/oliva	Velutínea	7,0	Cinza/oliva	Velutínea/flocosa
URM 5632	8,0	Cinza/oliva	Velutínea/flocosa	7,9	Oliva	Velutínea/flocosa
URM 4686	6,3	Cinza/oliva	Velutínea/flocosa	6,5	Cinza/oliva	Flocosa
URM 4032	3,5	Oliva	Velutínea	3,9	Oliva	Velutínea
URM 3721	4,0	Oliva/cinza	Velutínea/flocosa	3,8	Cinza/oliva	Velutínea
URM 3387	1,5	Acinzentada	Velutínea	1,5	Cinza/oliva	Velutínea/crostosa
URM 3176	5,8	Acinzentada	Flocosa	6,4	Acinzentada	Velutínea
URM 2972	4,5	Oliva	Velutínea	4,5	Acinzentada	Velutínea
URM 2942	2,5	Oliva/cinza	Velutínea	5,6	Cinza/oliva	Velutínea/flocosa

Tabela 4 - Características macroscópicas das culturas de *Cladosporium* em meio OA e SNA

URM	OA			SNA		
	Diâmetro (cm)	Cor	Textura	Diâmetro (cm)	Cor	Textura
URM 6703	6,0	Oliva	Velutínea/flocosa	4,8	Hialina/amarronzado	Velutínea/flocosa
URM 6511	3,3	Oliva	Velutínea	2,6	Oliva/cinza	Velutínea
URM 6502	6,2	Cinza/Oliva	Flocosa	5,5	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 6246	6,3	Oliva	Velutínea/flocosa	5,7	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 6119	6,4	Cinza/oliva	Flocosa	6,8	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 6084	5,5	Acinzentada	Velutínea	4,0	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 5843	4,5	Cinza/preto	Velutínea	5,9	Hialina/amarronzado	Velutínea
URM 5737	6,5	Oliva/cinza	Velutínea/Flocosa	6,7	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 5736	6,5	Cinza/Oliva	Velutínea/Flocosa	6,8	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 5448	6,2	Acinzentada	Velutínea/flocosa	5,5	Hialina/centro oliva	Velutínea/flocosa
URM 5379	3,4	Cinza/oliva	Velutínea/flocosa	3,0	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 5349	6,3	Cinza/oliva	Flocosa	5,5	Hialina/amarronzado	Velutínea
URM 5236	6,8	Cinza/oliva	Velutínea/flocosa	5,2	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 4837	5,3	Acinzentada	Velutínea/flocosa	4,0	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 4693	7,0	Cinza/oliva	Velutínea/flocosa	5,9	Hialina/amarronzado	Velutínea
URM 4465	4,8	Oliva	Velutínea	2,7	Oliva	Velutínea
URM 4168	6,5	Cinza/oliva	Velutínea/flocosa	6,2	Hialina/amarronzado	Velutínea

URM 4096	3,8	Cinza chumbo	Velutínea/flocosa	2,7	Oliva/amarronzado	Velutínea
URM 4030	6,5	Cinza/oliva	Flocosa	5,8	Hialina/amarronzado	Velutínea
URM 3865	6,6	Cinza/oliva	Flocosa	5,7	Hialina/centro oliva	Velutínea/flocosa
URM 3752	6,0	Cinza/oliva	Flocosa	6,0	Hialina/centro oliva	Velutínea/flocosa
URM 3654	6,0	Cinza/Oliva	Velutínea	6,0	Hialina/amarronzado	Velutínea
URM 3503	2,6	Cinza/oliva	Flocosa	3,0	Hialina/oliva	Velutínea
URM 3436	6,3	Cinza/oliva	Flocosa	6,0	Hialina/amarronzado	Velutínea
URM 3386	5,6	Oliva	Velutínea	5,5	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 3204	1,6	Preto/oliva	Velutínea/flocosa	2,3	Olva/cinza	Velutínea/flocosa
URM 3175	2,6	Preto/cinza	Velutínea	3,1	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 3107	5,7	Cinza/Oliva	Velutínea	4,6	Hialina/centro oliva	Velutínea/flocosa
URM 3101	6,5	Cinza/oliva	Velutínea/flocosa	4,9	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 3080	3,8	Cinza/oliva	Velutínea/flocosa	3,9	Oliva	Velutínea/flocosa
URM 2830	6,5	Cinza/oliva	Velutínea/flocosa	5,2	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 2567	6,0	Oliva/cinza	Velutínea	5,6	Hialina/amarronzado	Velutínea
URM 5632	6,7	Oliva	Velutínea	5,4	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 4686	6,3	Cinza/oliva	Velutínea	6,8	Hialina/amarronzado	Velutínea
URM 4032	3,0	Oliva	Velutínea	2,7	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 3721	3,8	Oliva	Velutínea/flocosa	3,2	Oliva/cinza	Velutínea
URM 3387	1,4	Cinza/preto	Velutínea	1,2	Oliva/preto	Velutínea
URM 3176	5,0	Acinzentada	Flocosa	4,6	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 2972	6,4	Acinzentada	Velutínea/flocosa	5,8	Hialina/centro oliva	Velutínea
URM 2942	5,4	Acinzentada	Velutínea/flocosa	5,8	Hialina/amarronzado	Velutínea

4.2 CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA

As culturas de fungos mantidas a 25°C sob luz UVA contínua em meio de cultura BDA e SNA por 7 dias, foram avaliadas quanto as características microscópicas como forma, comprimento e largura de conídios, presença de conidióforos macronematosos e micronematosos, ramoconídios, coloração, largura e septação das hifas.

4.2.1 *Cladosporium cladosporioides*

As culturas de *C. cladosporioides* crescidas em meio de cultura BDA, apresentaram hifas frequentemente septadas e numerosos conídios em cadeias, com cicatriz proeminente, de comprimento variando de (1) 2.2-8µm x 2-3µm de largura exibindo forma globosa, elipsóide e, frequentemente, limoniforme, e ausência de septos. Os ramoconídios e ramoconídios secundários apresentaram de 0-1 septo e tamanho variando de 7-24µm x 1-3µm. Presença de conidióforos macronematosos e micronematosos, originando-se lateralmente a hifa e de coloração marrom a levemente olivácea. Conidióforos macronematosos não ramificados de comprimento variando entre 17-110µm e 1-2µm de largura e micronematosos curtos, estreitos, não ramificados, variando de 11-17µm x 2-2.5µm (Figura 9). Para a espécie *C. halotolerans*, Oliveira *et al.* (2014) observaram o crescimento de conidióforos eretos, terminais ou laterais, oliva para marrom, septados, lisos e ramificados de tamanho variando de 10-77.5 × 2.5-5 µm, conídios formados em cadeia, não septados, de forma globosa, subglobosa e a maioria limoniforme, de comprimento e largura variando de 1.25-3.75 × 2.5-3.75 µm, após 14 dias em meio BDA a 25°C. Ogórek *et al.* (2012) analisaram as características microscópicas de isolados de *C. cladosporioides* cultivados em BDA por 10 dias em MEA a 20°C e verificaram a presença de conidióforos longos atingindo até 350 µm

x 2-6 μm , apresentando ramos com inúmeras cadeias de conídios de forma elipsoidal a limoniforme e parede lisa.

Em meio de cultura SNA, assim como em BDA, as hifas se apresentaram frequentemente septadas de coloração levemente amarronzada para oliva, originando conidióforos septados macronematosos e micronematosos, ramificados ou não. Os conídios foram formados em cadeias e apresentaram forma globosa, elipsóide, limoniforme, sem septos, variando em comprimento e largura de 3-7 μm x 1-2 μm , com cicatriz proeminente e formados em grandes quantidades. Os conidióforos macronematosos variaram de 47-165 μm x 2-2.6 μm e micronematosos de comprimento entre 16-18 μm x 1-2 μm de largura. Ramoconídios e ramoconídios secundários apresentaram de 0-1 septo e comprimento de 8-19 μm x 1-3 μm de largura (Figura 9). De acordo com Schubert *et al.* (2007), *C. cladosporioides* é morfológicamente comparável a algumas espécies pertencentes ao Complexo *Cladosporium herbarum*, mas desvia-se em ter conidióforos e conídios geralmente lisos, com os conídios sendo principalmente asseptados.

4.2.2 *Cladosporium tenuissimum*

Os fungos pertencentes a espécie *C. tenuissimum* e cultivados em meio de cultura BDA, exibiram conídios numerosos formados em cadeia com cicatriz evidente, de tamanho variado e comumente sem septos. Estes conídios variaram de 4 – 7 μm de comprimento a 2 – 2.5 μm de largura, e apresentaram forma elipsóide, limoniforme a globosa. As hifas frequentemente septadas apresentaram pigmento marrom esverdeado e originaram conidióforos macronematosos e micronematosos, ocasionalmente ramificados, apresentando septos ou não. Os conidióforos macronematosos apresentaram comprimento e largura variando de 46 - 70 μm x 2 - 3 μm e micronematosos 10 - 19 μm x 2 - 3 μm . Ramoconídios e ramoconídios secundários apresentando de 0-1 septo e comprimento entre 8 - 26 μm e 2 – 3 μm de largura.

Em meio de cultura SNA, *C. tenuissimum* apresentou conídios de forma elipsóide a limoniforme e comprimento variando de 3 - 7 μm e largura 2 - 3 μm . Hifas constantemente septadas de pigmentação marrom olivácea, conidióforos macronematosos ramificados ou não, de 38 - 54 μm de comprimento e 1 - 3 μm de largura. Conidióforos micronematosos variando de 12 - 15 μm de comprimento e 2 – 2.6 de largura. Ramoconídios e ramoconídios secundários muitas vezes apresentando septos de tamanho variado, entre 7 - 17 μm de comprimento e 2 – 2.3 μm de largura.

Em estudo realizado por Zalar *et al.* (2007) dentro do Complexo *Cladosporium sphaerospermum*, as observações microscópicas foram realizadas através do cultivo dos fungos em meio de cultura SNA a 25°C no escuro. A espécie *C. dominicanum* apresentou conidióforos laterais

e terminais, micronematosos e semimacronematosos de coloração olivácea para marrom de paredes finas, quase não septadas, podendo ser ramificado ou não ramificado. As cadeias de conídios apresentaram ramificação em todas as direções com conídios sem septos e ramoconídios foram raramente formados.

Figura 8 - Características microscópicas de *Cladosporium cladosporioides* em **BDA** – **A**. URM 3080 e **SNA**: **B** - URM 3865; **C** - URM 6119 e **D**. URM 6703. Características microscópicas de *Cladosporium tenuissimum* em **SNA** **E**. URM 3721; **F**. URM 3176 e **BDA** - **G**. URM 3387

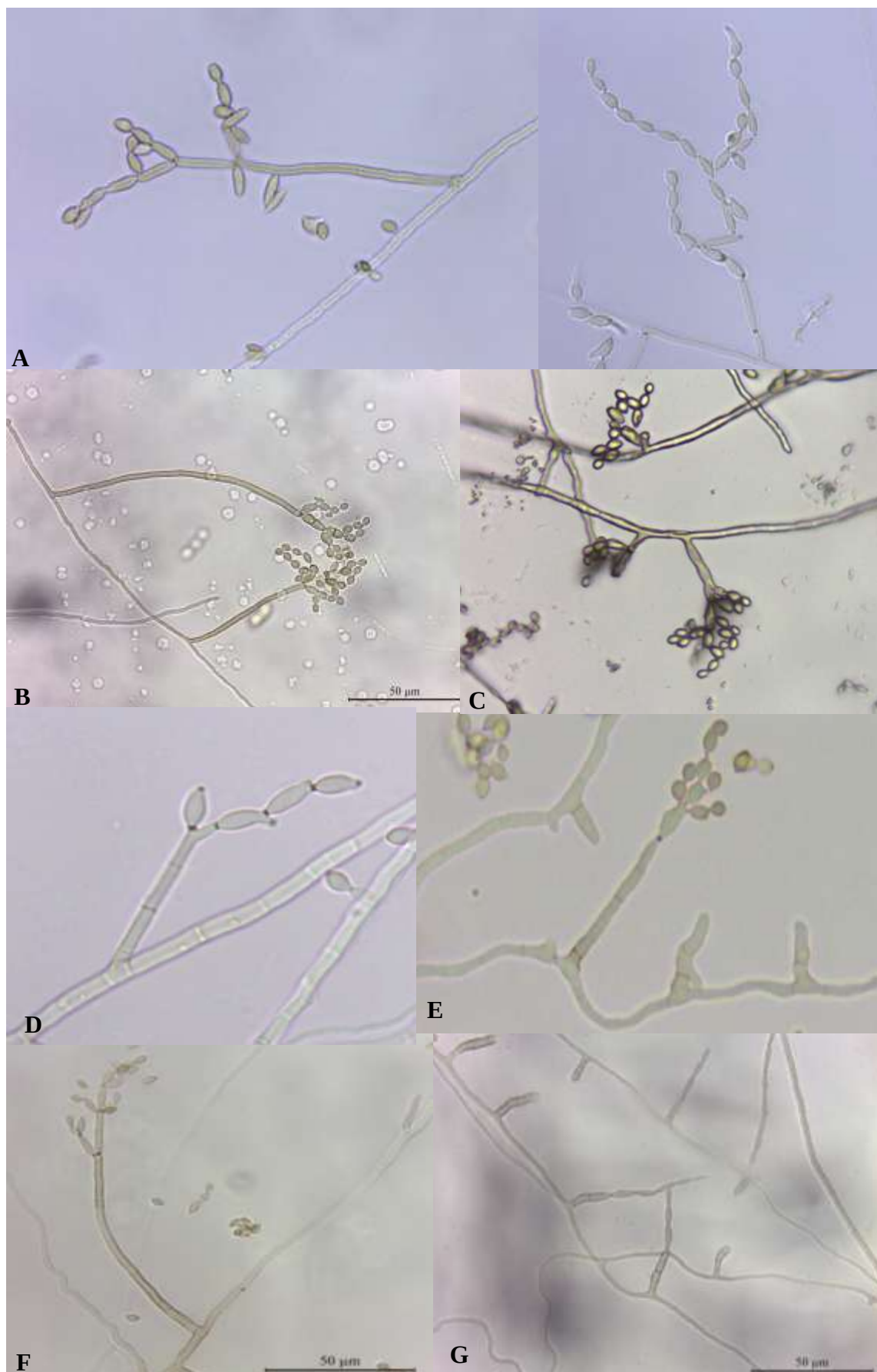


Tabela 5 - Características microscópicas das culturas de *Cladosporium* em meio SNA

URM	Espécie	SNA					
		Conidióforos	Ramoconídios	Septo	Conídios	Septo	Forma
6703	<i>C. cladosporioides</i>	14,4 - 77,4 x 1,9 – 2,7	6,3-13,4 x 2,5-3,9	0-1	3,9-8,1 x 1,7-3,5	0	Elipsóide/ limoniforme
6502	<i>C. cladosporioides</i>	73,0-195,4,0 x 2,9-3,2	8,7-14,4 x 3,1-5,2	0-1	3,1-7,4 x 2,6-3,7	0	Elipsóide/ limoniforme
6084	<i>C. cladosporioides</i>	16,4 x 1,9	6,5-9,8 x 1,5-1,8	0-1	3,8-5,2 x 2,0-2,4	0	Elipsóide
5349	<i>C. cladosporioides</i>	55,5-152,7 x 2,3-2,9	6,8-7,9 x 3,4-3,9	0-1	3,6-5,7 x 2,7-3,6	0	Globoso/elipsóid e/limoniforme
5236	<i>C. cladosporioides</i>	26,3-98,6 x 3,3-4,0	10,6-14,7x 3,3-3,7	0-1	4,8-7,9 x 2,8-3,7	0	Globoso/ elipsóide
4837	<i>C. cladosporioides</i>	112,0-162,1x1,7-3,,7	7,3-12,9x2,1-2,9	0	3,8-6,6x2,3x2,9	0	Limoniforme/ elipsóide
4693	<i>C. cladosporioides</i>	27,0 x 1,9	8,2 x 2,8	0	4,3-6,0 x 2,0-2,7	0	Elipsóide
4465	<i>C. cladosporioides</i>	78,4-165,3 x 2,0-3,3	8,6-10,3 x 2,4-3,4	0-1	4,3-5,9 x 2,0-2,9	0	Elipsóide/ limoniforme
3865	<i>C. cladosporioides</i>	7,9-18,6 x 1,3-1,5	5,4-8,4 x 2,2-2,9	0	3,0-6,0 x 2,0-2,7	0	Globoso/ elipsóide
3204	<i>C. cladosporioides</i>	9,8-75,0 x 1,2-2,0	5,0-10,1 x 1,8-2,1	0	3,3-5,4 x 1,6-2,0	0	Elipsóide
3175	<i>C. cladosporioides</i>	7,9-16,1 x 1,7-2,1	4,9-5,5 x 1,7-2,5	0	2,6-4,6 x 1,7-2,3	0	Globoso/elipsóid e/limoniforme
3080	<i>C. cladosporioides</i>	11,7-124,5 x 1,7-2,4	7,1-19,3 x 1,7-3,8	0-1	4,5-6,4 x 2,1-2,3	0	Elipsóide/ limoniforme
5632	<i>C. tenuissimum</i>	23,4-116,2 x 1,9-3,0	6,2-18,5 x 2,8x3,6	0-1	3,8-6,8 x 2,3-3,6	0	Limoniforme/ elipsóide
4032	<i>C. tenuissimum</i>	22,6-42,3 x 2,1-2,8	7,3-13,4 x 2,0-3,4	0-1	2,6-5,1 x 1,9-2,9	0	Globoso/ elipsóide
3721	<i>C. tenuissimum</i>	17,3-32,8 x 2,0-2,5	6,1-9,4 x 2,7-3,0	0	2,8-4,4 x 2,2-2,7	0	Globoso/elipsóid e/limoniforme
3387	<i>C. tenuissimum</i>	12,2-14,9 x 3,1-3,7	9,5-10,7 x 2,4-3,5	0	6,1-7,9 x 2,2-3,0	0	Elipsóide
3176	<i>C. tenuissimum</i>	34,9 – 63,3 x 2,1 – 3,5	4,6-16,8 x 1,9-2,9	0 – 1	3,2-6,6 x 1,9-2,8	0	Elipsóide/ limoniforme
2972	<i>C. tenuissimum</i>	12,1-54,2 x 1,9-2,6	6,4-17,7 x 2,1-3,3	0	3,0-5,8 x 2,2-3,0	0	Globoso/elipsóid e/limoniforme

4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FILOGENÉTICA

Foi realizada a extração do DNA genômico das 40 culturas de *Cladosporium* depositadas na Micoteca URM e a região ITS1-5.8S-ITS2, e os genes TEF (*Tef1*) e ACT amplificados. Os resultados obtidos do sequenciamento da espécie *C. cladosporioides* para a região ITS do rDNA ribossomal exibiram sequências de cerca de 500 pares de bases para todos os isolados. Para o gene da ACT, foram obtidos fragmentos de aproximadamente 230 pares de bases e o fator de alongamento da tradução (TEF) apresentou sequências com menos de 200 pares de bases. Os mesmos resultados foram encontrados para a espécie *C. tenuissimum*. Resultados aproximados foram encontrados por Bensch *et al.* (2012), que obtiveram fragmentos da região ITS com cerca de 630 pares de bases, TEF com 379 pares de bases e ACT com 230 pares de bases para a espécie *C. cladosporioides* e ITS com 587 pares de bases, TEF com 455 pares de bases, ACT com 229 pares de bases para *C. tenuissimum*.

Todas as culturas de fungos utilizadas neste estudo apresentaram valores de identidade igual ou superior a 97% com sequências de fungos do gênero *Cladosporium* depositadas no Banco de dados GenBank para as regiões ITS1-5,8S-ITS2, Actina e Fator de alongamento da tradução 1. Apesar das árvores filogenéticas construídas independentemente terem sido congruentes entre si,

uma análise concatenada da região ITS e dos genes TEF e ACT forneceu uma árvore com melhor resolução.

Inicialmente, com base apenas nas análises morfológicas, todos os 40 fungos do gênero *Cladosporium* depositados na Micoteca URM faziam parte do Complexo *Cladosporium cladosporioides*, contudo, com base na reconstrução filogenética dos fragmentos obtidos da região ITS e dos genes ACT e TEF, através do método de máxima verossimilhança (MV), Máxima parcimônia (MP) e Neighbor Joining (NJ), foi possível observar a formação de dois clados distintos, apesar de alguns valores de bootstrap serem considerados muito baixos. Para Schroers *et al.* (2009), apenas valores de bootstrap superiores a 90% são considerados altos e relevantes para determinação de espécies. No entanto, Schubert *et al.* (2007), ao estudar o Complexo *Cladosporium herbarum*, observaram que algumas culturas foram agrupadas num mesmo clado e consideraram este como um clado bem suportado ao apresentar valores de bootstrap partir de 71%.

Esses resultados demonstram que estas culturas depositadas na Micoteca URM pertencem a espécies do gênero, mas não necessariamente fazem parte de um mesmo Complexo, pois também apresentaram altos valores de identidade com espécies pertencentes ao Complexo de *Cladosporium sphaerospermum*.

A cultura URM 3721, anteriormente identificada como *C. tenuissimum* pela Micoteca URM, apresentou como resultado na busca de sequências mais similares no Banco de dados do GenBank, 100% de identidade com sequências da espécie *C. sphaerospermum* para a região ITS, e 99% com sequências de *C. halotolerans*, uma espécie pertencente ao Complexo *Cladosporium sphaerospermum*, para os genes ACT e TEF. Para a cultura URM 6511, identificada como *C. cladosporioides* através da análise morfológica, apresentaram 99% de identidade com sequências de *C. cycadicola* e *C. dominicanum* para a região ITS e o gene ACT, respectivamente. Na revisão do gênero, Bensch *et al.* (2012) mostram que *C. dominicanum* pertence ao Complexo *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cycadicola* é uma nova espécie que foi recentemente descrita e apresenta características morfológicas semelhantes a espécies pertencentes ao Complexo *C. sphaerospermum* (CROUS *et al.*, 2014).

A cepa de URM 3080, previamente identificada como *C. cladosporioides*, exibiu índices de identidade de 97% com a espécie *C. sphaerospermum* depositadas no GenBank e as culturas URM 4032, identificada como *C. tenuissimum* e URM 5379 como *C. cladosporioides* pela Micoteca URM, foram similares a sequências da espécie *C. dominicanum* com índices de identidade de 99% para a região ITS e gene ACT. A cultura URM 3175 identificada pela Micoteca URM como *C. cladosporioides*, apresentou altos valores de identidade com sequências de *C. halotolerans* para a região ITS e os genes ACT e TEF. Todas as outras espécies analisadas neste estudo foram agrupadas em um clado a parte com sequências pertencentes ao Complexo *Cladosporium*

cladosporioides. Por exemplo, os fungos URM 2830, URM 6502, URM 6119, URM 3101, URM 6246, URM 3865, URM 6703, URM 5349, URM 3386, URM 5843, URM 3107, URM 5737, URM 3752, URM 4693, URM 3654 e URM 4168 pertencentes a espécie *C. cladosporioides* de acordo com a análise morfológica realizada pela Micoteca URM, apresentaram valores entre 98 e 99% de identidade com sequências da espécie de *C. cladosporioides* depositadas no GenBank para a região ITS e valores entre 98 e 100% com espécie de *C. tenuissimum* para os genes ACT e TEF. Assim como, a cultura URM 2942 identificada inicialmente como *C. tenuissimum* pela Micoteca URM, foi similar a sequências de espécies de *C. cladosporioides* com base na busca pela região ITS no banco de dados do GenBank, contudo, para o gene ACT e TEF apresentou altos valores de identidade com espécies de *C. flabelliforme*.

Na análise filogenética realizada por Bensch *et al.* (2010), a espécie *C. cladosporioides* forma um clado distinto e bem suportado. No entanto, os autores consideram *C. cladosporioides* ainda parafilético, pois representa um complexo de espécies com muitos isolados excluídos por serem indistinguíveis morfológicamente de *C. cladosporioides* s. str., mas filogeneticamente diferentes. Ainda neste estudo dentro do Complexo *Cladosporium cladosporioides*, os autores concluíram que a região ITS apresentou uma resolução limitada em muitas espécies de *Cladosporium* e utilizaram os resultados obtidos dos genes TEF e ACT para uma comparação da estabilidade do clado. Por exemplo, para outros gêneros de fungos como *Trichoderma*, a região ITS foi anteriormente considerada a melhor escolha para identificação em nível de espécie, mas atualmente é considerada inadequada na distinção de espécies estreitamente relacionadas em vários clados do gênero. Em contraste, o fator de alongamento da tradução 1- α (TEF), responsável por codificar uma parte essencial no mecanismo de tradução de proteínas, tem grande utilidade filogenética, sendo altamente informativo em nível de espécie dentro do gênero *Fusarium* (GEISER *et al.*, 2004; BISSETT, 2009).

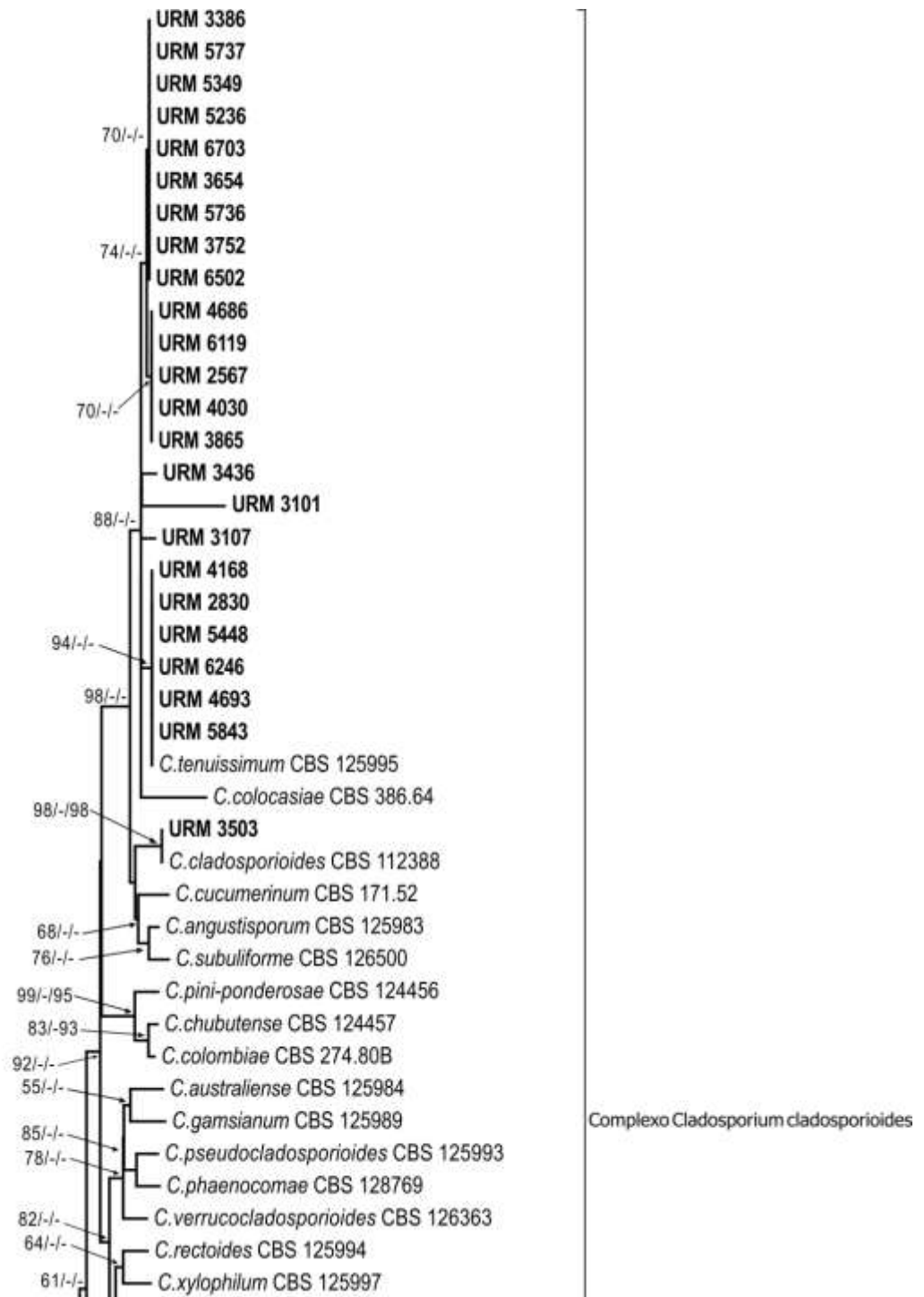
A cepa de registro URM 2972 depositada como *C. tenuissimum* na Micoteca URM, através da busca no GenBank, apresentou alto índice de identidade com fungos da espécie *C. perangustum* depositadas no banco de dados tanto para a região ITS como para os genes ACT e TEF. *Cladosporium perangustum* é uma espécie que também pertence ao Complexo *Cladosporium cladosporioides* e apresentam como características microscópicas a presença de hifas filiformes, pouco ramificadas de 1-4 μ m de largura, septadas. Conidióforos variando em tamanho e largura de 12-130(-150) $\times$ (1.5-) 2-3.5 (-4) μ m, 0-6 septos, ramoconídios normalmente asseptados, mas podendo apresentar 1 septo, conídios numerosos de forma ovóide, limoniforme, elipsóide. Bensch *et al.* (2010) consideram essas duas espécies muito semelhantes morfológicamente, mas observaram variações filogenéticas claras que foram apoiadas por alterações nas sequências de nucleotídeos para ambos os genes ACT e TEF. Para a cultura URM 3503, a identificação morfológica realizada

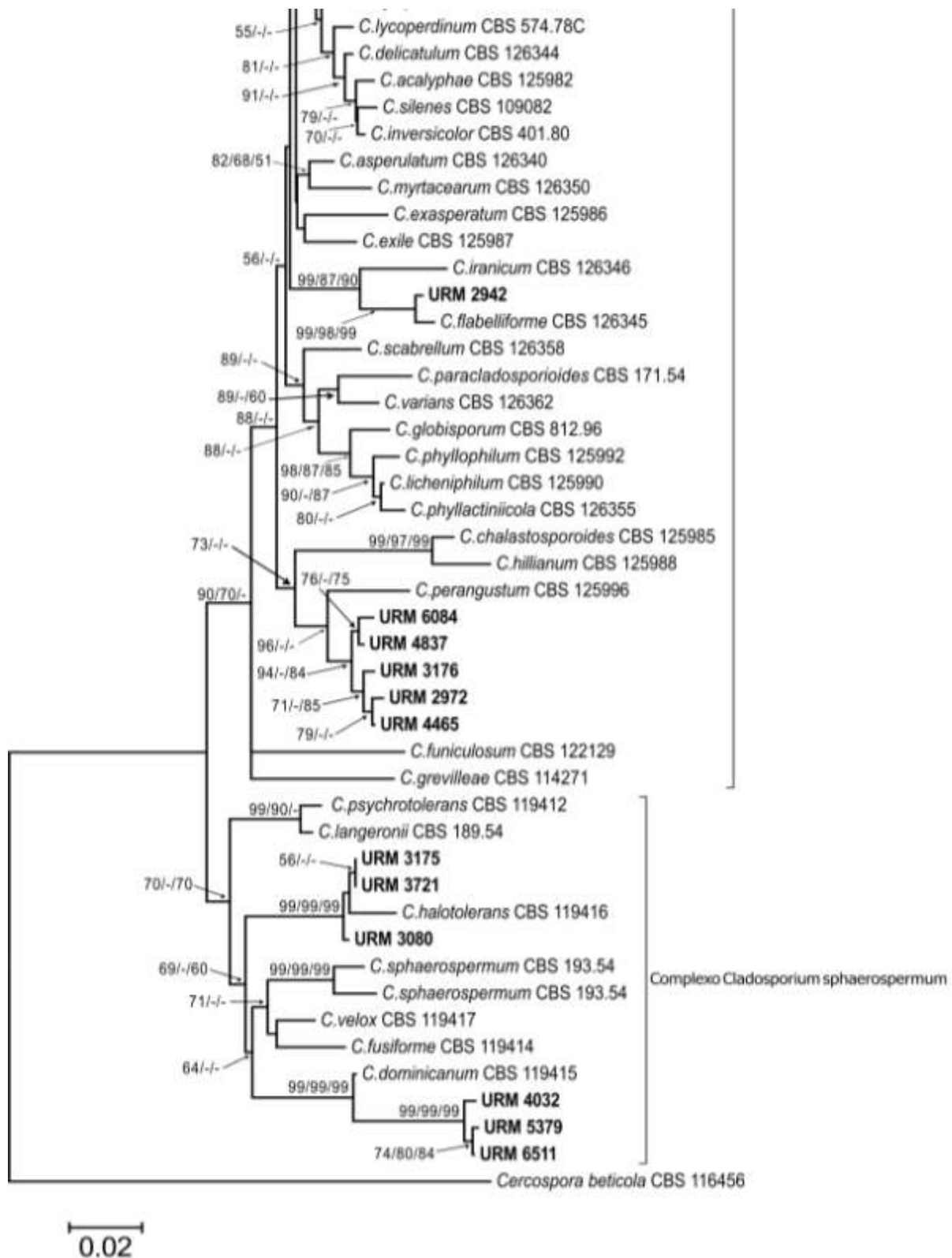
pela Micoteca URM descreveu esta como a espécie *C. cladosporioides*, correspondendo aos resultados encontrados pela busca de sequências similares no GenBank para a região ITS e os genes ACT e TEF.

Espécies similares morfológicamente foram alocadas em clados distintos na análise filogenética molecular, mostrando dessa forma a necessidade do uso do sequenciamento para auxiliar a identificar e delimitar as diferentes linhagens pertencentes ao complexo. Comparações baseadas apenas em caracteres morfológicos de culturas de *Cladosporium* podem não ser suficientes devido a um possível alto grau de homoplasias causadas por convergência, ou seja, é possível inferir se as características morfológicas altamente conservadas dentro do complexo representam convergência (homoplasias), simplesiomorfias ou sinapomorfias.

Seifert *et al.* (2004), com base em características morfológicas, moleculares e ecológicas, separaram a espécie *Cladosporium staurophorum* de *Cladosporium* s. str. introduzindo esta em um novo gênero de Hyphomycetes, o gênero *Devriesia*. A cultura URM 3387 foi depositada na Micoteca URM no ano 1994, com base apenas na análise de caracteres fenotípicos, como *C. tenuissimum*. O depósito na Micoteca foi realizado antes deste novo gênero ter sido descrito, e o estudo molecular realizado com base no sequenciamento da região ITS e através da ferramenta BLAST de busca por sequências similares no Banco de dados do GenBank mostrou índice de similaridade de 99% desta cultura com o gênero *Devriesia*, sendo assim, retirada deste trabalho por não pertencer ao Complexo *Cladosporium cladosporioides*.

Figura 9 - Reconstrução filogenética de espécies do Complexo *Cladosporium cladosporioides* depositados na Micoteca URM da UFPE a partir do alinhamento de nucleotídeos relativos à combinação dos fragmentos ITS1 + 5.8S + ITS2 (rDNA), Actina e Fator de alongamento da tradução 1- α . Valores de bootstrap (em %) foram gerados a partir dos métodos de Neibghor Joining, Máxima Verossimilhança e Máxima Parcimônia, com as distâncias de Kimura 2-parâmetros (5000 bootstrap) e encontram-se expressos da esquerda para a direita, respectivamente. Somente valores acima de 50% foram apresentados. *Cercospora beticola* (número de acesso ao GenBank AY840527, AY840458, AY840494) foi usado como grupo externo.





5 CONCLUSÃO

As espécies *Cladosporium cladosporioides* e *C. tenuissimum* pertencentes ao Complexo *Cladosporium cladosporioides* são morfológicamente semelhantes, sendo observadas apenas pequenas variações no tamanho dos conidióforos e conídios. Culturas de diferentes isolados de uma mesma espécie podem apresentar algumas variações morfológicas, sendo mais frequentes variações no tamanho dos conidióforos e na coloração das colônias. Com base nos resultados obtidos das análises morfológicas macroscópicas e microscópicas, todas as culturas analisadas neste estudo estão revisadas e autenticadas taxonomicamente.

O sequenciamento da região ITS e dos genes Actina (ACT) e fator de alongamento da tradução 1- α (*Tef1*) são necessários para suplementar as análises morfológicas para correta identificação das culturas pertencentes ao Complexo *Cladosporium cladosporioides*, sendo a ACT e o TEF os marcadores moleculares com maior poder resolutivo.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. **Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB**. Universitas Ciências da Saúde – 02: 236-25. 2003. Disponível em: <<http://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/index.php/cienciasaude/article/viewFile/535/356>>.
- AGANETTE, E.; ALVARENGA, L.; SOUZA, R. R. **Elementos constitutivos do conceito de Taxonomia**. *Informação & Sociedade: Estudos*, 20(3). 2010.
- ALCANTARA, M. et al. **Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos**. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 6: 1-20. 2012.
- ALDANA, B. R. V., BILLS, G., ZABALGOGUEAZCOA, I. **Are endophytes an important link between airborne spores and allergen exposure?** *Fungal Diversity*, 60: 33-42. 2013.
- ALI, S.S. et al. **Antineoplastic Activity in L-asparaginase of *Cladosporium Cladosporioides***. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 8: 68-70. 1993.
- ALONSO, S. F. B. ***Cladosporium*: género fúngico que deteriora soportes documentales y afecta a la salud del hombre**. *Boletín del Archivo Nacional*, 18-19-20: 104-118. 2012.
- ASSANTE, G. et al. **Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus***. *Mycological Research*, 108: 170 – 182. 2004.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; INÁCIO, C. A. **Taxonomia de Fungos**. In: Taxonomia: Microbiana, de Procariontes, de Fungos, de Protozoários e de Vírus. CGEE, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Ciência, Tecnologia e Inovação. 2006.
- Barbosa, M. A. G. et al. **Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization**. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, 32(2). 2001.
- BARROS, F. **Filogenia × taxonomia: um caso de amor e ódio**, Anais, 30º Encontro sobre temas de genética e melhoramento "Evolução, sistemática e biologia de populações de orquídeas" Piracicaba – SP. 2013.
- BASTOS, S.C. **Pectinases de *Cladosporium cladosporioides* (fres.) De Vries: Condições de cultivo, purificação parcial e caracterização**. *Tese de Doutorado*. Lavras-MG. 2012.
- BATTA, Y. A. ***Cladosporium tenuissimum* Cooke (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a causal organism of new disease on cucumber fruits**. *European journal of plant pathology*, 110: 1003-1009. 2004.
- BENSCH, K. et al. **Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*)**. *Studies in Mycology*. 67: 1–94. 2010.
- BENSCH, K. et al. **The genus *Cladosporium***. *Studies in Mycology* 72: 1–401. 2012.
- BEZERRA, J.D.P. et al. **Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012.
- BEZERRA, J.D.P. et al. **Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study**. *Symbiosis* 60: 53-63. 2013.
- BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. D. **Fungos anemófilos na Praia do Laranjal, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil**. *Arq. Inst. Biol*, 72: 93-97. 2005.
- BISSETT, J. **Preferred primers for sequencing the 5' end of the translation elongation factor-1 α gene (eEF1 α 1)**. *International Subcommission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy*. 2009. Disponível em <<http://www.isth.info/biodiversity/index.php>>.
- BRAUN, U. **Miscellaneous notes on some cercosporoid hyphomycetes**. *Bibliotheca Lichenologica* 86: 79–98. 2003.
- BROWN, K.B.; HYDE, K.D.; GUEST, D.I. **Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia**. *Fungal Diversity* 1: 27–51. 1998.

- BUENO-SILVA, M. **"Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios.** *Estud. Biol., Ambiente Divers.* 34: 157-163. 2012.
- CAMACHO PÉREZ, A. I.; ÁLVAREZ DORDA, B.; REY FRAILE, I. **Integrating DNA and morphological taxonomy to describe a new species of the family Bathynellidae (Crustacea, Syncarida) from Spain.** *Graellsia*, 69: 179-200. 2013.
- CARBONE, I.; KOHN, L.M. **A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes.** *Mycologia* 91: 553–556. 1999.
- CLAUS, H.; FILIP, Z. **Degradation and transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*.** *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 26: 180-185. 1998.
- CORDA, A.C.J. **Icones fungorum hucusque cognitorum.** v. 1. 1837.
- CROUS, P.W.; KANG, J.C.; BRAUN, U. **A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequences and morphology.** *Mycologia* 93: 1081–1101. 2001.
- CROUS, P.W. et al. **Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*.** *Studies in Mycology* 55: 235–253. 2006.
- CROUS, P. W. et al. **Fungal Planet description sheets: 214–280.** *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 32: 184. 2014.
- DAVID, J.C. **A contribution to the systematics of *Cladosporium*.** Revision of the fungi previously referred to *Heterosporium*. *Mycological Papers* 172: 1–157. 1997.
- DOBOŞ, L.; PUIA, C. **The Effect of Bioremediation on the Microbial Consortia of Oil Polluted Soil.** *ProEnvironment* 4: 264 – 267. 2011.
- DONNISON, L. M. et al. **Management influences on soil microbial communities and their function in botanically diverse haymeadows of Northern England and Wales.** *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 253-263. 2000.
- DUGAN, F.M. et al. **Morphological plasticity in *Cladosporium sphaerospermum*.** *Persoonia* 21: 9–16. 2008.
- DUGAN, F.M.; SCHUBERT, K.; BRAUN, U. **Check-list of *Cladosporium* names.** *Schlechtendalia* 11: 1–103. 2004.
- EL-MORSY, E.M. **Fungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt.** *Fungal Diversity* 5: 43–54. 2000.
- ELLIS, M.B. ***Dematiaceous hyphomycetes*.** CMI, Kew. 1971.
- ELLIS, M.B. ***More dematiaceous hyphomycetes*.** CMI, Kew. 1976.
- FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P. **O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil.** *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 22: 18–21. 2001.
- FARR, D.F. et al. **Fungi on plants and plant products in the United States.** APS Press, St. Paul, MN. 1989.
- FERNANDES-MATIOLI, F. M. **Noções de Filogenética Molecular.** *Biológico, São Paulo*, 63: 37-38. 2001.
- FILHO, N.P.; SILVA, K.F.S.; LOPEZ, A.N.Q. **Decomposição fúngica de ácido tânico e outros compostos em efluente agroindustrial.** *Acta Scientiarum Technology* Maringá, 33: 145-153. 2011.
- FISHER, P.J.; PETRINI, O. **Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.).** *New Phytologist* 120, 137. 1992.
- FLANNIGAN, B. **Microorganisms in indoor air.** In: *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control*. (Flannigan, B., Samson, R.A., Miller, J.D., eds). Taylor e Francis, London, p. 17–31. 2001.
- FRIES, E.M. ***Systema mycologicum*,** Vol. 3. E. Moritz, Greifswald. 1832.
- FUJII, Y. et al. **Twelve-membered lactones produced by *Cladosporium tenuissimum* and the plant growth retardant activity of cladospolide B.** *Phytochemistry*, 40: 1443-1446. 1995.
- FUNGARO, M.H.P. **PCR na Micologia – Diagnóstico e Análise de Variabilidade.** *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 14: 12–16. 2001.

- FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. **Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins.** *Studies in Mycology* 49: 1-174. 2004.
- GEISER, D.M. et al. **FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*.** *European Journal of Plant Pathology* 110: 473-479. 2004.
- GIRÃO, M. D. et al. **Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, 37: 229-233. 2004.
- GOMES, S. I. F. Caracterização morfológica e molecular de *Tricholoma equestre* / *T. Auratum* para uma abordagem taxonômica. **Dissertação de Mestrado.** Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. 2011.
- GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. **Developments in fungal taxonomy.** *Clinical Microbiology Reviews* 12: 454-500. 1999.
- GUIMARÃES, L. C. Métodos de preservação de fungos potencialmente toxicogênicos. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Federal de Lavras-MG. 2011.
- HALL, T.A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Ser. 41:95-98. 1999.
- HEUCHERT, B.; BRAUN, U.; SCHUBERT, K. **Morphotaxonomic revision of fungicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes).** *Schlechtendalia* 13: 1-78. 2005.
- HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. **Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference.** *Quarterly Review of Biology*, Ithaca, 66: 411- 453. 1991.
- HOOG, G.S. et al. **Atlas of clinical fungi, 2nd ed.** CBS, Utrecht and Universitat rovíra I virgili, Reus. 2000.
- INFANTE, F. et al. **A comparative study of the incidence of *Cladosporium* conidia in the atmosphere of five spanish cities.** *Polen*, 10: 15-23. 1999.
- ITAKO, A. T. et al. **Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais.** *Arq. Inst. Biol*, 76: 75-83. 2009.
- KAWASAKI, M. et al. **Different genes can result in different phylogenetic relationships in *Trichophyton* species.** *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 49: 311-318. 2008.
- KEELING, P. J.; INAGAKI, Y. **A class of eukaryotic GTPase with a punctate distribution suggesting multiple functional replacements of translation elongation factor 1 α .** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(43). 2004.
- KURAMAE, E.E.; SOUZA, N.L. **Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA.** *Acta Scientiarum*, Maringá, 24(5). 2002.
- Larena, I. et al. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology*, 75: 187-194. 1999.
- LARKIN, M.A. et al. **Clustal W and Clustal X version 2.0.** *Bioinformatics* 23:2947-2948. 2007.
- MACHADO, A. P. S. Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água. **Dissertação de Mestrado.** Escola de Engenharia da Universidade do Minho. 2006.
- MENEZES, J. P. et al. **Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*.** *Ciência agrotécnica, Lavras*, 34: 132-139. 2010.
- MENEZES, C. P. **Atividade antifúngica in vitro de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (erva cidreira) sobre *Cladosporium carrionii*.** *Dissertação de Mestrado.* João Pessoa-PB. 2012.
- MOREIRA, M. G. Diversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O., Kuntze. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Federal de Ouro Preto. 2013.
- MULLINS, J. **Microorganisms in outdoor air.** In: *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control* (Flannigan B, Samson RA, Miller JD, eds). Taylor & Francis, London: 3-16. 2001.

- NAKASONE, K. K.; PETERSON, S. W.; JONG, S. C. **Preservation and distribution of fungal cultures.** *Biodiversity of Fungi*, p. 37-47. 2004.
- NAKAZATO, L. Desenvolvimento de um sistema de expressão em *Metarhizium anisopliae* baseado no promotor homólogo do gene *tef-1* α . **Tese de Doutorado.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre. 2005.
- NARAIN, A.; ROUT, G.B. **A tomato rot caused by *Cladosporium tenuissimum*.** *Indian Phytopathology* v. 34, p. 237– 238. 1981.
- NARAIN, A. et al. **A new leaf blight and fruit rot of watermelon.** *Indian Phytopathology* 38: 149–151. 1985.
- NASCIMENTO, T. L. et al. **Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity.** *Fungal Ecology* 14: 79-86. 2015.
- OGÓREK, R. et al. **Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi.** *Mikologia Lekarska*, 19: 80-85. 2012.
- OLIVEIRA, R. J. V. et al. ***Cladosporium* species from hypersaline environments as endophytes in leaves of *Cocos nucifera* and *Vitis labrusca*.** *Micotaxon*. 129: 25–31. 2014.
- OLIVEIRA, T. O. Identificação molecular e produção de pectinases por isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Federal de Lavras. 2011.
- OLIVEIRA, J. S. **Distribuição do fungo *Cladosporium cladosporioides* em regiões produtoras de café na Bahia.** *Bahia Agrícola*, 6(3). 2004.
- O'DONNELL, K. et al. **Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(5). 1998.
- PANDEY, K.N.; GUPTA, R.C. **A new leaf spot disease of banana caused by *Cladosporium tenuissimum* in India.** *Madras Agricultural Journal*. 70: 559. 1983.
- PASSADOR, M. M. et al. **Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”.** *Biológico, São Paulo*, [online], 72: 51-55. 2010.
- PEÑA, C. **Métodos de inferência filogenética.** *Revista Peruana de Biología*, 18: 265-267. 2011.
- PEREIRA, R. G.; BORÉM, F. M.; VILELA, T. **Caracterização microbiológica e qualidade da bebida de cafés (*Coffea arabica* L.) da região Alto Rio Grande – Sul de Minas Gerais.** In: Simpósio de pesquisas do café do Brasil, 2. Vitória, ES. Resumos. Brasília, Embrapa Café. 2001.
- PEREIRA, R. T. G. Influência de *Cladosporium cladosporioides* na qualidade da bebida do café. **Dissertação de mestrado.** Lavras : UFLA, p. 42. 2002.
- PEREIRA, R. T. G.; PFENNING, L. H.; CASTRO, H. A. D. **Caracterização e dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** *Ciência Agrotec*, v. 29. 2005.
- POSADA, D.; CRANDALL, K.A. **Modeltest: testing the model of DNA substitution.** *Bioinformatics* 14: 817-818. 1998.
- PRASIL, K.; HOOG, G.S. **Variability in *Cladosporium herbarum*.** *Transactions of the British Mycological Society* 90: 49–54. 1988.
- QUADROS, M.E. et al. **Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: estudo de caso e análise crítica dos padrões atuais.** *Engenharia. Sanitaria e Ambiental*. 14(3). 2009.
- RESANO, A.; SANZ, M.L.; OEHLING, A. **Sensitization to *Alternaria* and *Cladosporium* in asthmatic patients and its in vitro diagnostic confirmation.** *The Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 8: 353–358. 1998.
- RIESEN, T.; SIEBER, T. **Endophytic fungi in winter wheat (*Triticum aestivum* L.).** *Swiss Federal Institute of Technology, Zürich*. 1985.
- SAITOU, N.; NEI, M. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Molecular biology and evolution*, 4: 406-425. 1987.
- SAMSON, R. et al. **Introduction to food- and airborne fungi**, 6th ed. CBS, Utrecht. 2000.
- SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? *Med. Mycol.*, v. 47. 2009.
- SAMUELS, G. J.; SEIFERT, K. A. **The impact of molecular characters on systematic of filamentous ascomycetes.** *Annual review of phytopathology*, 33: 37-67. 1995.

- SANTOS, F. R.; ORTEGA, J. M. **Bioinformática aplicada à Genômica. Melhoria Genômica, Minas Gerais: UFV. 2003.**
- SANTOS, F. R.; GUIMARÃES, P. E.; REDONDO, R. A. **Bancos de DNA: coleções estratégicas para estudos da biodiversidade. Lundiana, 3: 93-98. 2002.**
- SANTOS, C. et al. **Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. Research in Microbiology. 161: 168-175. 2010.**
- SARQUIS, M.I.M. et al. **Production of L- asparaginase by filamentous fungi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99: 489-492. 2004.**
- SCHLOTTERER, C. et al. **Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in Drosophila. Molecular Biology and Evolution, Oxford, 11: 513-522. 1994.**
- SCHROERS, H. J. et al. **Taxonomy and phylogeny of the Fusarium dimerum species group. Mycologia, [S.l.], 101: 44-70. 2009.**
- SCHUBERT, K.; BRAUN, U. **Taxonomic revision of the genus Cladosporium s. lat. 6. New species, reallocations to and synonyms of Cercospora, Fusicladium, Passalora, Septonema and Stenella. Nova Hedwigia 84: 189-208. 2007.**
- SCHUBERT, K. et al. **Biodiversity in the Cladosporium herbarum complex (Davidiellaceae, Capnoidiales), with standardisation of methods for Cladosporium taxonomy and diagnostics. Studies in Mycology, 58: 105-156. 2007.**
- SEIFERT, K. A. et al. **Devriesia, a new hyphomycete genus to accommodate heat-resistant, cladosporium-like fungi. Canadian Journal of Botany, 82(7), 914-926. 2004.**
- SHARPE, R. A. et al. **Indoor fungal diversity and asthma: A meta-analysis and systematic review of risk factors. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2014.**
- SHI, M.M. **Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. Clinical Chemistry, 47: 164-172. 2001.**
- SILVA, D.C.V. et al. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. Revista Brasil. Bot., 34: 607-610. 2011.**
- SOLA, M. C. **Manutenção de Microrganismos: Conservação e Viabilidade. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 8(14). 2012.**
- SOUZA-MOTTA, C. **Caracterização do acervo da Micoteca URM visando a disponibilização de culturas como fonte de recursos biotecnológicos. 2012.**
- SOUZA-MOTTA, C. M. et al. **Identification and characterization of filamentous fungi isolated from the sunflower (Helianthus annuus L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolyse inulin. Brazilian Journal of Microbiology 34: 273-280. 2003.**
- STRINGARI, D. **Sistemática e diversidade genética de isolados de Guignardia spp. e Phyllosticta sp. nos estados do Paraná e São Paulo. Tese de Doutorado. Curitiba-PR. 2009.**
- SWOFFORD, D.L. PAUP. **Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 2003.**
- TARKKA, M. T. et al. **Molecular characterization of actin genes from homobasidiomycetes: Two different actin genes from Schizophyllum commune and Suillus bovinus. Gene 251: 27-35. 2000.**
- VAILLANT, M. **A work aimed to Project the health of the documental heritage conservators, International Conference on Conservation and Restoration of Archive and Library Materials Preprints, Erice, 22-29 April, p. 137-142. 1996.**
- VALENZUELA, E.; LEIVA, S.; GODOY, R. **Variación estacional y potencial enzimático de microhongos asociados con la descomposición de hojarasca de Nothofagus pumilio. Revista Chilena de Historia Natural, Santiago, 74(4). 2001.**
- VIANA, G. V. R. **Técnicas para construção de árvores filogenéticas. Tese de Doutorado. Fortaleza: UFCE. 2007.**
- VRIES, G.A. **Contribution to the knowledge of the genus Cladosporium Link ex Fr. CBS, Baarn. 1952.**

- WHITE, T.J. et al. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. 315–322, in Innis MA, Gelfand, D.H.; Shinsky, J.J.; White, T.J., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego. 1990.
- WIRSEL, S.G.R. et al. **Four or more species of *Cladosporium* sympatrically colonize *Phragmites australis***. *Fungal Genetics and Biology* 35: 99–113. 2002.
- ZALAR, P. et al. **Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments**. *Studies in Mycology* 58: 157–183. 2007.
- ZHANG, A. W. et al. **Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean**. *Phytopathology*. 88: 1306 -1314. 1998.
- ZHANG, P.; ZHOU, P. P.; YU, L. J. **An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2**. *Current microbiology*, 59: 227-232. 2009.
- ZOPPAS, B. C. A; VALENCIA-BARRERA, R. M.; FERNÁNDEZ-GONZÁLES, D. **Distribuição de esporos de *Cladosporium* spp no ar atmosférico de Caxias do Sul, RS, Brasil, durante dois anos de estudo**. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 34(2). 2011.