



**PROSPECÇÃO DE ESPÉCIES DE *PENICILLIUM*
TALAROMYCES PRESENTES EM SOLOS DE ÁREAS
DE MATA ATLÂNTICA, PERNAMBUCO, BRASIL E
DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO
COMPLEXO LIGNINOLÍTICO**

JULYANNA CORDOVILLE FONSECA

**RECIFE
2016**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**PROSPECÇÃO DE ESPÉCIES DE *PENICILLIUM* E
TALAROCYCES PRESENTES EM SOLOS DE ÁREAS DE MATA
ATLÂNTICA, PERNAMBUCO, BRASIL E DETECÇÃO DA
PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO COMPLEXO LIGNINOLÍTICO**

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 Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia básica e aplicada

Orientador: Prof^aDr^a Cristina Maria de Souza-Motta

Co-orientador: Dra. Lidiane Roberta Cruz da Silva

RECIFE

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Fonseca, Julyanna Cordoville

Prospecção de espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* presentes em solos de áreas de Mata Atlântica, Pernambuco, Brasil e detecção da produção de enzimas do complexo ligninolítico. / Julyanna Cordoville Fonseca- Recife: O Autor, 2017.

56 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Cristina Maria de Souza-Mota

Coorientadora: Lidiane Roberta Cruz da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, Recife, 2017.

Inclui referências

- 1. Fungos filamentosos 2. Biomas 3. Mata Atlântica I. Souza-Mota, Cristina Maria de (orient.) II. Silva, Lidiane Roberta Cruz da (coorient.) III. Título**

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-641

JULYANNA CORDOVILLE FONSECA

**PROSPECÇÃO DE ESPÉCIES DE *PENICILLIUM* *PENICILLIUM* E
TALAROCYCES PRESENTES EM SOLOS DE ÁREAS DE MATA
ATLÂNTICA, PERNAMBUCO, BRASIL E DETECÇÃO DA
PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO COMPLEXO LIGNINOLÍTICO**

Data de aprovação: 04/03/2016

Comissão Examinadora

MEMBROS TITULARES

Profa. Dra. Cristina Maria de Souza-Motta - Micologia/ UFPE

Dra. Marília de Holanda Cavalcanti Maciel - USP

Dra. Minelli Albuquerque Sousa - Micologia/ UFPE

MEMBROS SUPLENTES

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães – Micologia/ UFPE

Profa. Dra. Idjane Santana de Oliveira - CAV/ UFPE

“Os grandes feitos são
conseguidos não pela força,
mas pela perseverança”.

Samuel Johnson

Dedicatória

À Deus e a minha família, que compartilhou
comigo cada passo e cada conquista.

AGRADECIMENTOS

A meu Deus, que sempre esteve ao meu lado, realizando grandes maravilhas em minha vida.

A toda minha família, especialmente meus maravilhosos pais Vanildo Gomes e Lucili Cordoville, e meu irmão Eduardo Henrique por acreditarem em meu potencial desde sempre.

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), a todos que fazem parte do departamento de Micologia e ao PPGBF.

Ao suporte financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) durante os anos de estudo e pesquisa para realização deste projeto

À Professora Dra. Cristina Maria de Souza Motta, pela orientação e “puxões de orelha” quando precisei.

À minha querida co-orientadora Dra. Lidiane Roberta Cruz, pela oportunidade, pelos ensinamentos, por todo carinho e paciência comigo. E por se mostrar uma amiga e mãe científica. Muito obrigada.

Aos amigos e companheiros da Micoteca URM, que sempre alegravam meus dias, que sempre estavam dispostos a me ajudar. A minha eterna irmã científica Juliana, pelo suporte de sempre. À Felipe Oller pela disponibilidade, auxílio e carinho desde sempre. Agradeço aos que me auxiliaram na execução do projeto, Ivana, Joenny e especialmente Renan sem vocês não teria conseguido.

À minha turma de mestrado que durante esse tempo mostraram todo companheirismo e amizade.

RESUMO

Dentre os fungos comumente isolados de solo e com extrema relevância na natureza destacam-se espécies do gênero *Penicillium*. A taxonomia de *Penicillium* com base na morfologia é bastante complexa dessa forma, para complementar e validar a identificação uma importante ferramenta é a biologia molecular. Além da relevante importância ambiental, espécies de *Penicillium* possuem largo potencial biotecnológico, dentre as várias enzimas produzidas por *Penicillium* spp. estão as enzimas do complexo ligninolítico (lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase). Diante disso nossos objetivos foram conhecer a diversidade de espécies de *Penicillium* isoladas do solo próximo a Reserva Ecológica de Saltinho, e avaliar um representante de cada espécie quanto à capacidade de produzir enzimas do complexo ligninolítico. Foram realizadas três coletas de solo, no entorno da REBIO Saltinho, a APA de Guadalupe, em três áreas de ecossistemas diferentes: restinga, tabuleiro e manguezal. Os fungos foram isolados e identificados morfologicamente através da observação de características macroscópicas e microscópicas e utilizando técnicas moleculares, de amplificação das regiões ITS1 e ITS2 e do gene β -tubulina. Alguns índices ecológicos como diversidade de Shannon, equitabilidade de Pielou e dominância de Simpson foram calculados. Posteriormente em frascos de Erlenmeyers foi preparado o meio basal para a Fermentação Submersa (FSm) acrescido de uma suspensão de esporos, o material foi incubado por sete dias a 28°C. Após esse período de cultivo, os meios de cultura foram filtrados e o extrato bruto foi utilizado na determinação das atividades ligninolíticas. No total foram obtidos 227 linhagens de *Penicillium* do solo de Mata Atlântica de Pernambuco, destes, 75 foram isolados de solo de manguezal, 86 de tabuleiro e 66 de restinga. Ao todo, foram identificadas oito espécies de *Penicillium*: *P. wotroi*; *P. herquei*, *P. singorense*; *P. simplicissimum*; *P. citrinum*; *P. sclerotiorum*; *P. toxicarium* *P. expansum* e três *Talaromyces* (antes *Penicillium*), sendo: *T. verruculosus*; *T. cnidii* *T. pinophilum*. De acordo com o índice de diversidade de Shannon-Wiener manguezal apresentou maior diversidade como também maior riqueza em relação ao tabuleiro e restinga. Dos 25 isolados de *Penicillium* e *Talaromyces* testados quanto à produção de enzimas ligninolíticas foram produtores das três enzimas, apresentando atividade máxima para Lignina peroxidase (LiP) de 477 U/L⁻¹ por *P. herquei* 4; para Lacase (LaC) de 701 U/L⁻¹ por *P. sclerotiorum* para Manganês peroxidase (MnP) de 133 U/L⁻¹ por *P.*

sclerotiorum que está sendo indicado para ser utilizado em estudos posteriores de otimização da produção de enzimas do complexo ligninolítico.

Palavras-chave: Fungo filamentoso. Morfologia. Biologia molecular. Enzimas ligninolíticas.

ABSTRACT

Among the fungi commonly isolated from ground and extremely relevant in nature stand out species of the genus *Penicillium*. The *Penicillium* taxonomy based on morphology is quite complex thereby to supplement and validate the identification is an important tool in molecular biology. In addition to the significant environmental importance, *Penicillium* species have broad potential biotech, among the various enzymes produced by *Penicillium* spp. are enzymes ligninolytic complex (lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase). In view of this our objectives were to know the diversity of *Penicillium* species isolated from the soil near Saltinho Ecological Reserve, and to evaluate a representative of each species as to the capacity to produce enzymes of the ligninolytic complex. Three soil samples were taken in the vicinity of REBIO Saltinho, APA of Guadalupe, in three areas of different ecosystems: salt marsh, mangrove and board. The fungi were isolated and identified morphologically by observing macroscopic and microscopic features and using molecular techniques, amplification of ITS1 and ITS2 regions and the β -tubulin gene. Some ecological indices such as Shannon diversity, evenness and Simpson dominance were calculated. Subsequently in Erlenmeyer flasks was prepared from the basal medium of Bonugli-Santos et al. (2010), and wheat bran as substrate for submerged fermentation (FSM) plus a spore suspension for 28 ° C for seven days in a static way. After this period of cultivation, the culture media were filtered and the crude extract was used for the determination of ligninolytic activity. A total of 227 strains obtained from *Penicillium* Atlantic Forest soil Pernambuco, of these, 75 were isolated from mangrove soil, 86 board and 66 sandbanks. In all, eight species of *Penicillium* have been identified, namely: *Penicillium wotroi*; *P. herquei*, *P. singorense*; *P. simplicissimum*; *P. citrinum*; *P. sclerotiorum*; *P. toxicarium* and *P. expansum* and three *Talaromyces* (formerly *Penicillium*), as follows: *T. verruculosus*; and *T. cnidipnophilum*. According to the diversity index Shannon-Wiener mangrove showed greater diversity but also richer in relation to the board and sandbank. Of the 25 isolates tested *Penicillium* and *Talaromyces* for the production of ligninolytic enzymes were producers of the three enzymes having maximum activity for lignin peroxidase (LiP) 477 U / L⁻¹ *P. herquei*; for laccase (LAC) of 701 U / L⁻¹ *P. sclerotiorum* and manganese peroxidase (MnP) 133 U / L⁻¹ *P. sclerotiorum* being suitable for use in subsequent studies optimization of the production of enzymes ligninolytic the complex.

Key-words:*Penicillium*. Morphology.Molecular biology.Ligninolytic enzymes.

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Principais biomas do Brasil, baseados nas ecorregiões terrestres. Fonte: IBGE (2004).	13
Figura 2. Vista de uma área da Reserva Ecológica de Dois Irmãos. Fonte: Espécies de <i>Penicillium</i> em solos de caatinga e Mata Atlântica, produção de tanase e detecção do potencial micotoxigênico / Lidiane Roberta Cruz da Silva. – Recife, 2013.	16
Figura 3. Área de Manguezal localizada na APA de Guadalupe e entorno da REBIO Saltinho. Fonte: Julyanna Fonseca.	18
Figura 4. Área de Tabuleiro localizada na APA de Guadalupe e entorno da REBIO Saltinho. Fonte: Julyanna Fonseca	19
Figura 5. Área de Restinga localizada na APA de Guadalupe e entorno da REBIO Saltinho. Fonte: Julyanna Fonseca	20
Figura 6. Conidióforo (“ <i>Penicillus</i> ”). Fonte: Onions e Brady (1987).	22
Figura 7. Reconstrução filogenética de Máxima verossimilhança dos fragmentos concatenados da região ITS1-5.8S-ITS2 e da beta tubulina dos isolados de <i>Penicillium</i> e <i>Talaromyces</i> isolados a partir de amostras de solo de Manguezal, Restinga e Tabuleiro. Valores de suporte calculados com 1000 bootstrap. Modelo de substituição de Kimura 2-parametros. Sequencias obtidas nesse estudo estão em destaque.	43
Figura 8. Dendrograma de similaridade representativos das comunidades de fungos filamentosos isolados do solo de manguezal, tabuleiro e restinga.	46

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1. Características macroscópicas e microscópicas das espécies de <i>Penicillium</i> isoladas de solo de Mata Atlântica.	40
Tabela 2. Numero de isolados das espécies de <i>Penicillium</i> de solo de Mata Atlântica.	44
Tabela 3. Número de Indivíduos, Riqueza de Espécies, Diversidade de Shannon-Wiener (H'), Equitabilidade de Pielou (e) e Dominância de Berger-Parker de fungos filamentosos isolados de solo manguezal, tabuleiro e restinga e análise de cada solo.	46
Tabela 4. Atividade enzimática de enzimas ligninolíticas Lignina peroxidase, Lacase e Manganês peroxidase (MnP).	47

Sumário

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 Biomias brasileiros	15
2.2 Bioma Mata Atlântica	16
2.2.1 <i>Manguezal</i>	19
2.2.2 <i>Tabuleiro</i>	21
2.2.3 <i>Restinga</i>	22
2.3 Fungos de solo	23
2.4 Gênero <i>Penicillium</i> Link	24
2.4.2 <i>Espécies de Penicillium isoladas de solo</i>	26
2.4.3 <i>Avanços na Taxonomia de Penicillium</i>	29
2.5 Enzimas Ligninolíticas	33
2.5.1 <i>Lacase</i>	34
2.5.2 <i>Manganês peroxidase</i>	35
2.5.3 <i>Lignina peroxidase</i>	35
3 OBJETIVOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Área de estudo	37
4.2 Coleta do solo	38
4.3 Isolamento dos Fungos	38
4.4 Purificação e identificação das espécies de <i>Penicillium</i>	38
4.5 Análise ecológica	40
4.6 Seleção de isolados de <i>Penicillium</i> quanto à produção de enzimas ligninolíticas	40
4.7 Métodos analíticos	40
4.7.1 <i>Atividade de lacase</i>	40
4.7.2 <i>Atividade de lignina peroxidase (LiP)</i>	41
4.7.3 <i>Atividade de manganês peroxidase</i>	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um Hotspot mundial, ou seja, uma das áreas mais ricas em biodiversidade e mais ameaçadas do planeta e também decretada Reserva da Biosfera pela Unesco e Patrimônio Nacional, na Constituição Federal de 1988. Somados todos os fragmentos de floresta nativa acima de 3 hectares, temos atualmente 12,5%. A composição original da Mata Atlântica é um mosaico de vegetações definidas como florestas ombrófilas densa, aberta e mista; florestas estacionais decidual e semidecidual; campos de altitude, mangues e restingas (SOS Mata Atlântica 2015). No Brasil, após degradação e desmatamento das áreas de mata, sobretudo para plantio de culturas de interesse econômico, apenas 2% da superfície original estão protegidas legalmente em unidades de conservação dos tipos mais restritivos, como Parques Nacionais e Reservas Biológicas (Câmara, 1996; Trindade et al., 2005).

Dentre os fungos comumente isolados de solo e com extrema relevância na natureza (pois participam ativamente na reciclagem da matéria orgânica), destacam-se espécies do gênero *Penicillium*. A maioria destas espécies não são muito exigentes nutricionalmente, apresentando a capacidade de crescer em qualquer ambiente onde exista uma mínima, mesmo que complexa, fonte de carbono orgânico. (Pitt, 1991).

Devido à grande variabilidade do gênero, e ao grande número de espécies descritas, a taxonomia de *Pencillium* com base na morfologia torna-se bastante complexa. Essa dificuldade torna necessária a busca de novas ferramentas a fim de complementar e validar a identificação, entre elas estão a biologia molecular, que juntamente com os dados de morfologia e bioquímica, caracterizam uma taxonomia polifásica (Santos et al., 2009).

Além da relevante importância ambiental na ciclagem de matéria orgânica, espécies de *Penicillium* possuem largo potencial biotecnológico, sendo amplamente utilizadas para a produção de enzimas de interesse industrial, ambiental, farmacêutico, alimentício, entre outros. (Bon et al., 2008).

Dentre as várias enzimas produzidas por *Penicillium* spp. estão as enzimas do complexo ligninolítico incluindo algumas fenoloxidasas (lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase). As enzimas lignina (LiP) e manganês peroxidase (MnP) pertencem a classe das peroxidases e oxidam seus substratos pela redução de um elétron com a

formação de um radical catiônico. As lacases são consideradas verdadeiras fenoloxidasas e oxidam fenóis e estruturas ligninolíticas fenólicas pela abstração de um elétron com formação de radicais que podem repolimerizar ou levar a despolimerização (Higuchi, 1989). Esse grupo de enzimas tem sido descrito como responsável pela degradação de vários poluentes orgânicos (Pointing, 2001). Esta característica é uma vantagem no uso de fungos ligninolíticos na biorremediação.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biomas brasileiros

Define-se bioma como uma área do espaço geográfico, com dimensões de até mais de um milhão de quilômetros quadrados (km²). Este espaço apresenta um macroclima definido, uma determinada fitofisionomia ou formação vegetal, fauna e outros organismos vivos associados, e outras condições ambientais, como altitude, solo, alagamentos, salinidade, entre outras. Estas características todas conferem ao bioma uma estrutura e uma funcionalidade peculiares, ou seja, apresenta ecologia própria (Coutinho, 2006).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística -IBGE (2011), o Brasil abriga cerca de 13% da biota mundial, sendo considerado um país megadiverso. Compreende seis biomas (Amazônia, Caatinga, Campos Sulinos, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal), além das áreas marinha e costeira (Figura 1), apresentando o maior sistema fluvial do mundo e a biota continental mais vasta da Terra, com alto nível de endemismo.

A Mata Atlântica já foi muito fragmentada pela agricultura e pela presença de centros urbanos, como o Rio de Janeiro e São Paulo, sua cobertura natural no Brasil foi reduzida para menos de 15% de sua área, e 80% dos remanescentes têm menos de 50 ha (Tabarelli et al., 2005; Tabarelli et al., 2010).



Figura 1. Principais biomas do Brasil, baseados nas ecorregiões terrestres. Fonte: IBGE (2004).

2.2 Bioma Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um dos 25 “hotspots” mundiais de biodiversidade, considerada a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano. Originalmente estendia-se de forma contínua ao longo da costa brasileira, penetrando até

o leste do Paraguai e nordeste da Argentina em sua porção sul, cobrindo mais de 1,5 milhões de km², com 92% desta área no Brasil (Tabarelli et al., 2005).

O Decreto Federal 750/93 considera Floresta Atlântica como formações florestais e ecossistemas associados inseridos no domínio Mata Atlântica, com as respectivas delimitações estabelecidas pelo Mapa de Vegetação do Brasil do IBGE: Floresta Ombrófila Densa Atlântica, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, manguezais, restingas, campos de altitude, brejos interioranos e encaves florestais do Nordeste (SOS Mata Atlântica, 2011).

No Brasil, este bioma está presente tanto na região litorânea como nos planaltos e serras do interior do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, ao longo de toda costa brasileira. A área principal ou central está nas grandes Serras do Mar e da Mantiqueira, abrangendo os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo. No Nordeste Oriental, a Floresta Atlântica ocupa as restingas e, principalmente, a formação dos tabuleiros costeiros, desde o Rio Grande do Norte até Alagoas. Ao sul de Pernambuco e em Alagoas, reveste também as costas das serras baixas próximas à costa, além de existir disjunções de Mata Atlântica isoladas nos topos de chapadas sedimentares e nos cumes das serras interioranas do Nordeste, Bachamadas de Brejos de Altitude (Barbosa; Thomas 2002). A Mata Atlântica é composta por uma série de fitofisionomias, que propiciaram uma significativa diversidade ambiental e, como consequência, a evolução de um complexo biótico de natureza vegetal, animal e microbiológico altamente rico (Cruz et al., 2007).

Englobando vários ecossistemas florestais, apresentando interpenetrações de outros ecossistemas não florestais, a Mata Atlântica ocorre associada aos ecossistemas costeiros de mangues, nas enseadas, foz de grandes rios, baías e lagunas de influência de marés; às restingas, nas baixadas arenosas do litoral; às florestas mistas com araucárias, no Paraná e em Santa Catarina; e aos campos de altitude e rupestres, localizados em altitudes acima de 900 m, nos cumes das Serras da Bocaina, na Mantiqueira, no Caparaó, entre outros. Em função da latitude, longitude, relevo e clima, apresenta variações nas formações vegetais sem perder, no entanto, certa homogeneidade florística (Barbosa; Thomas 2002).

O solo é em geral bastante raso, pouco ventilado, sempre úmido, sobretudo por receber pouca luz, pois a maior parte da luminosidade é absorvida pelas folhas das árvores mais altas. Trata-se de um solo pobre, porém com fertilidade garantida pela presença da serrapilheira que recobre a superfície do solo (Cruz et al., 2007).

No Brasil, durante a época da colonização, foi a primeira floresta a receber iniciativas de colonização; desde então vários ciclos se desenvolveram no seu domínio. O resultado de todos os ciclos econômicos pelos quais a Floresta Atlântica passou foi a perda quase total das florestas originais e a contínua devastação e fragmentação dos remanescentes florestais existentes, o que a coloca em péssima posição de destaque, como um dos conjuntos de ecossistemas mais ameaçados de extinção do mundo. O uso indiscriminado dos recursos naturais da Mata Atlântica pelo homem tem causado sérios problemas, sendo talvez o maior deles a perda da biodiversidade (Resende et al., 2002).

De acordo com Tabarelli et al. (2005), a floresta já perdeu mais de 93% de sua área, restando menos de 100.000km² de vegetação. Algumas áreas de endemismo, como no estado de Pernambuco, agora possuem menos de 5% de sua floresta (Figura 2). Entretanto, de acordo com Myers et al. (2000), a Mata Atlântica ainda abriga muitas espécies endêmicas de plantas vasculares, anfíbios, répteis, aves, mamíferos e micro-organismos. Dentre os micro-organismos, destacam-se os fungos, principalmente pelo relevante papel na decomposição e ciclagem de matéria orgânica, necessitando de estudos taxonômicos e levantamentos ecológicos quanto às comunidades que habitam o solo deste bioma, sendo que trabalhos acerca de fungos da Mata Atlântica são escassos.



Figura 2. Vista de uma área da Reserva Ecológica de Dois Irmãos. Fonte: Espécies de *Penicillium* em solos de caatinga e Mata Atlântica, produção de tanase e detecção do potencial micotoxigênico / Lidiane Roberta Cruz da Silva. – Recife, 2013.

2.2.1 *Manguezal*

O manguezal é um tipo de vegetação de ambiente periodicamente inundado pela maré (Figura 3), caracterizado por solo sempre encharcado, com alta salinidade, um ambiente litorâneo de baixa energia (pouca atividade de ondas), sendo assim favorável o estabelecimento de espécies de angiospermas lenhosas como *Rhizophora mangle* L. (mangue vermelho), *Laguncularia racemosa* L. Gaertn. (mangue branco) e *Avicennia schaueriana* Stap. (mangue preto). (Lamberti 1969; Schaeffer-Novelli 1995).

Estima-se que de 7.408 km do litoral brasileiro, 6.786 km contêm florestas de mangue (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 2000). Esses manguezais são áreas muito importantes do ponto de vista ecológico, constituindo locais de convergência das águas continentais e marinhas, das suas faunas, floras e seus sedimentos. Sua cobertura vegetal apresenta um aspecto peculiar condicionado pela pluviometria, granulometria do sedimento, temperatura e hidrodinâmica dos fluxos de água doce (rio) e salgada (mar) (OLIVEIRA, 1984).

A reduzida diversidade de espécies nos manguezais é um reflexo de seu sedimento lodoso instável e deficiente em oxigênio, além da existência de uma variação rítmica da salinidade (Araújo et al., 2011). No entanto, os manguezais são considerados, e muitas vezes relatados em estudos como ambientes altamente produtivos. Para Santos *et al.* (1993), esse ecossistema é o elo de ligação entre os ambientes dulciaquícolas, marinho e terrestre. Este ambiente também tem por característica o acúmulo de grandes massas de sedimento e detritos, que são aproveitados por espécies endêmicas do manguezal, como também exportado para outros ambientes, propiciando um local de características marcantes, no que se refere à densidade populacional da fauna e flora.

Os manguezais ainda possuem funções importantes para o equilíbrio ambiental, funcionando como indicador biológico para as modificações de linha de costa, em função da rápida resposta das suas espécies vegetais a qualquer alteração no ambiente. É o ecossistema que responde mais acentuadamente a processos geomorfológicos, sedimentares e oceanográficos que controlam a evolução da paisagem. Assim, tanto o crescimento desordenado das áreas urbanas e das atividades, ali realizadas, como as alterações ambientais e climáticas afetam o seu desenvolvimento (ALMEIDA; SOARES; KAMPEL, 2008). Segundo Araújo et al., (2011), as áreas de manguezal são aquelas que, entre os ecossistemas costeiros, sofrem maiores riscos, tanto biológicos quanto socioeconômicos devido aos inúmeros tipos de degradação que acontecem no seu entorno, mas também são regiões onde as medidas de manejo, quando bem estudadas e planejadas, resultam em significativa melhoria ambiental. Dessa forma, estudos que ressaltem a importância socioeconômica e ambiental deste ecossistema são necessários, a fim de despertar o interesse na preservação do mesmo.



Figura 3. Área de manguezal localizada na APA de Guadalupe e entorno da REBIO Saltinho. Fonte: Julyanna Fonseca, 2014.

2.2.2 *Tabuleiro*

A denominação de tabuleiro é dada pelo fato da topografia apresentar-se plana em grandes extensões, não atingindo altitudes superiores a 200m (Rizzini 1979). A vegetação do tabuleiro é caracterizada por árvores e arbustos dispersos ou agrupados em manchas e por uma cobertura herbácea (OLIVEIRA-FILHO et al. 1986).

As matas sobre os tabuleiros distinguem-se das outras formações de mata atlântica por ocuparem uma extensa área de planície ou tabuleiro costeiro (Figura 4), de origem terciária, com suas espécies distribuídas ao longo de um gradiente climático (sentido litoral-interior) (Rizzini 1979, Moreno *et al.* 1998).

Segundo os agricultores e extrativistas, os atributos dos solos e a vegetação que ocorrem no tabuleiro indicam solos de melhor fertilidade. Para eles, o tabuleiro é o local mais indicado para a construção das moradias, quintais com espécies frutíferas e hortaliças irrigadas, ou para o cultivo de algumas espécies perenes adaptadas às condições de baixa disponibilidade de água do solo, como também para a criação de pequenos animais e pastagens. As matas sobre tabuleiros terciários sofreram uma intensa fragmentação, com o processo de desmatamento na costa brasileira durante a

colonização e, mais recentemente (1960-1980) com a agricultura e com a industrialização (Rizzini 1979, Giulietti e Forero 1990). Ainda hoje podem ser encontradas áreas de retirada ilegal de madeiras nestas formações. Com isso, restaram apenas alguns remanescentes florestais distribuídos ao longo da região costeira dos estados do nordeste até o estado do Rio de Janeiro. Entretanto, poucos são os estudos realizados neste tipo de ecossistema.



Figura 4. Área de tabuleiro localizada na APA de Guadalupe e entorno da REBIO Saltinho. Fonte: Julyanna Fonseca, 2014.

2.2.3 Restinga

A restinga é caracterizada por uma vegetação característica de zonas costeiras (Suguiu e Tessler, 1984), ocorrem revestindo praias, dunas, ou cordões litorâneos (Figura 5). Apresenta-se como um ecossistema costeiro, geologicamente recente, composto por um conjunto diversificado de comunidades biológicas distintas, florística e fisionomicamente. São comuns em solos arenosos pouco desenvolvidos, pobres em matéria orgânica e com baixa capacidade de reter água e nutrientes, formando complexos vegetacionais pioneiros. Compreende fisionomias originalmente herbáceas/subarbustivas, arbustivas ou arbóreas, que variam de acordo com a inundação

do terreno e o teor da salinidade. Pode apresentar-se em mosaico ou em certa zonação, geralmente no sentido oceano-continente, ocorrendo aumento tanto da lenhosidade e da altura da vegetação, como também do número de espécies ocorrentes (Falkenberg 1999; Sampaio *et al.* 2005). Cerca de 5.000 Km do litoral brasileiro é ocupado pelo ecossistema de restinga, localizados na interface entre os ambientes marinho e continental, possuindo uma fragilidade intrínseca (SILVA, 2000). É preciso destacar a importância de estudos ecológicos que pode informar de medidas de conservação.



Figura 5. Área de restinga localizada na APA de Guadalupe e entorno da REBIO Saltinho. Fonte: Julyanna Fonseca, 2014.

2.3 Fungos de solo

O solo contém provavelmente maior número de indivíduos e maior diversidade que qualquer outro habitat ou ecossistema. É um complexo biológico dinâmico em que cada um dos diferentes organismos tem seu papel-chave na manutenção e sobrevivência das comunidades (Martins; Barbosa *et al.*, 2015).

Os micro-organismos fazem parte do solo de maneira indissociável, sendo responsáveis por inúmeras reações bioquímicas relacionadas não só com a transformação da matéria orgânica, mas também com o intemperismo das rochas. Assim, os micro-organismos do solo desempenham papel fundamental na gênese do solo e ainda atuam como reguladores de nutrientes, pela decomposição da matéria

orgânica e ciclagem dos elementos, atuando, portanto, como fonte e dreno de nutrientes para o crescimento das plantas, influenciando assim diretamente a fertilidade do solo, os fatores químicos e físicos do solo, a formação das estruturas e manutenção dos agregados de solo contribuindo para sua produtividade e conseqüentemente para a manutenção dos ecossistemas (Allsop; Seal 1986; Andreola e Fernandes 2007; Pereira et al. 2007).

Alguns dos principais fatores que afetam a ocorrência e distribuição dos micro-organismos no solo são: a disponibilidade de substrato orgânico e nutrientes minerais; fatores ambientais como temperatura, umidade, aeração e pH; mineralogia do solo; vitaminas, hormônios, aminoácidos e características dos próprios micro-organismos, tais como, capacidade mutagênica, indução/repressão enzimática, capacidade de esporulação. No solo, os fungos são encontrados em comunidades variando de 10^4 a 10^6 organismos por grama e embora não sejam os micro-organismo em maior abundância no solo representam de 70 - 80 % da biomassa microbiana do mesmo (Martins; Alexander 1977). Estão presentes essencialmente em todos os substratos e possíveis ecossistemas, podendo agir como sapróbios, parasitas de plantas, animais e fungos, ou serem simbioses de organismos como cianobactérias, algas e plantas vasculares. Dentre todos os grupos de fungos mais representativos do solo estão espécies do gênero *Penicillium* (Cruz et al., 2013).

2.4 Gênero *Penicillium* Link

Espécies do gênero *Penicillium* são de extrema importância na natureza, pois participam ativamente de ciclos biogeoquímicos, atuando na decomposição de matéria orgânica. Podem ser encontradas em todos os ecossistemas, embora o solo seja seu habitat natural. Devido à sua elevada competência metabólica, não são muito exigentes nutricionalmente, tolerando uma imensa variedade de condições físico-químicas, como disponibilidade de água, temperatura e pH. É exatamente esta alta tolerância a extremas condições que lhes conferem capacidade de crescer em qualquer ambiente que lhes proporcione desde o mínimo de sais minerais ou as mais complexas fontes de carbono (Onions; Brady, 1987).

Penicillium é um dos diversos gêneros de fungos que se reproduzem através da produção de esporos denominados de conídios, originados a partir de estruturas

denominadas conidióforos. São anamorfos, incluídos no Filo Ascomycota, Classe Plectomycetes, Ordem Eurotiales e Família Trichocomaceae (Alexopoulos et al., 1996).

Em 1809 Link descreveu o gênero, propondo o nome *Penicillium*, do Latim *Penicilius*, por observar que espécies do gênero produzem conidióforos em forma de pincel. Em 1910, Thom designou *P. expansum* como espécie tipo para o gênero (Raper; Thom, 1949).

A taxonomia clássica se baseia na observação das características macroscópicas e microscópicas das espécies. Macroscopicamente é observada a coloração das colônias e do reverso; produção de pigmentos que modificam a tonalidade do meio de cultura; produção gotas de exudato de coloração diversa; a textura da colônia (velutínea, com textura aveludada; flocosa ou lanosa) são considerados critérios taxonômicos. Essas características estão sob controle genético e podem ou não serem expressas (Pitt, 1991; Raper e Thom 1949). Microscopicamente em espécies de *Penicillium* são observadas hifas septadas (Pitt, 1991). Os conidióforos (esporóforos) surgem como ramos do micélio (Figura 6). A estrutura do conidióforo consiste de um estipe que, dependendo da espécie, pode ser estreito ou alargado, apresentar parede delgada ou espessa, lisa ou rugosa. No ápice do estipe surge o “*Penicillus*”, células conidiogênicas, denominadas fiálides, que podem incidir diretamente no estipe, ou em células de apoio denominadas métulas e ramos. Algumas espécies apresentam um estágio mais avançado, denominado râmulo, localizado entre a métula e o ramo (Onions; Brady, 1987; Pitt, 1991).

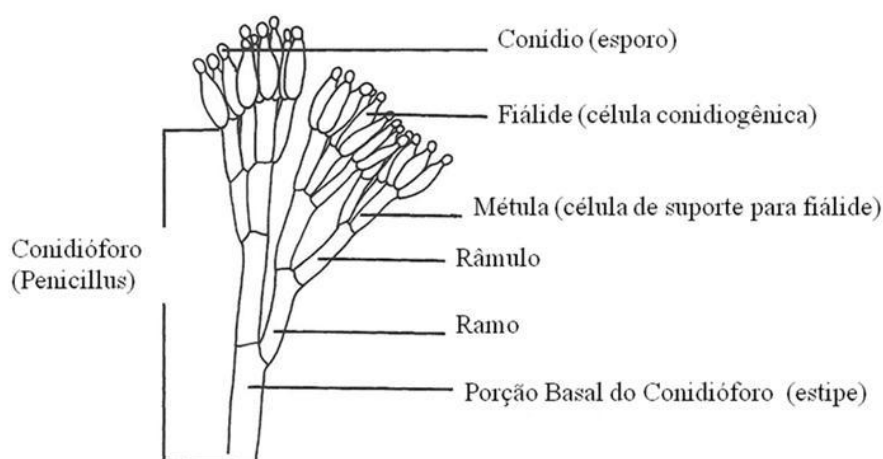


Figura 6. Conidióforo (“*Penicillus*”). Fonte: Onions e Brady (1987).

É no interior das fiálides que os conídios são formados (Raper; Thom, 1949). Os conídios são unicelulares, uninucleados, asseptados, hialinos, pequenos, com formas que variam de globosas a cilíndricas. Dependendo da espécie, a parede pode ser lisa, rugosa, fortemente rugosa ou espinosa. Algumas espécies produzem esclerócios, estruturas de resistência que podem permanecer latentes por longos períodos até as condições do meio serem propícias ao seu desenvolvimento.

Devido à complexidade morfológica dos conidióforos do gênero *Penicillium*, foi necessário agrupar espécies que possuíssem padrão de ramificação similar. Para determinação do subgênero ao qual o isolado de *Penicillium* pertence, deve-se contar, de cima para baixo, o número de pontos de ramificação entre o estipe e as fiálides, sendo considerado o tipo de conidióforo predominante (Onions; Brady, 1987). De acordo com Pitt (1991), são classificadas como: monoverticiladas, biverticiladas, terverticiladas e quarteverticiladas.

2.4.1 Espécies de *Penicillium* isoladas de solo

Em 2000, Asan realizou um levantamento das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* reportadas na Turquia, provenientes de diversos substratos, com a finalidade de integrar as publicações e servir de base para futuros trabalhos que venham propor novos registros de ambos os gêneros para este país. Foram listadas 154 espécies de *Penicillium*.

Chen et al. (2002), baseados apenas em taxonomia clássica, relataram uma nova espécie de *Penicillium* isolada de solo em Taiwan. A espécie possui padrão de ramificação biverticilado e produz sinêmio. Apresenta fiálides acerosas, sendo denominada *P. calidicanum* J.L. Chen, incluída no subgênero *Biverticillium* Dierck, seção *Coremigenum* (Biourge) de acordo com Pitt (1979) e série *Duclauxii* de acordo com Raper & Thom (1949).

Avaliando a diversidade de fungos presentes na rizosfera de girassol (*Helianthus annuus* L.), Souza-Motta et al. (2003) isolaram e identificaram 49 espécies. Dentre os gêneros isolados, *Penicillium* foi o mais representativo, com nove espécies, sendo: *P. citreonigrum*, *P. fellutanum*, *P. janthinellum*, *P. oxalicum*, *P. restrictum*, *P. variabile*, *P. verruculosum*, *P. vinaceum* e *P. waksmanii*.

Em 2004, Asan publicou novo levantamento de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* reportadas na Turquia. De acordo com o autor, do gênero *Penicillium*, *P. chrysogenum* é a espécie mais comum na Turquia.

Buscando conhecer a diversidade de espécies de Trichocomaceae na Reserva Natural Katandra, Austrália, presentes em solo seco, típico de mata, serrapilheira, folhas e detritos, Markovina et al. (2005) encontraram maior diversidade de espécies de *Penicillium* em relação ao gênero *Aspergillus*. Foram isolados *P. lilacinus*, *P. aurantiogriseum*, *P. bilae*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. decumbens*, *P. dendriticum*, *P. expansum*, *P. P. glabrum*, *P. herquei*, *P. italicum*, *P. janczewskii*, *P. janthinellum*, *P. lividum*, *P. loliense*, *P. miczynskii*, *P. minioluteum*, *P. ochrasalmoneum*, *P. palixii*, *P. quercetiorum*, *P. restrictum*, *P. sclerotiorum*, *P. simplicissimum*, *P. soppi*, *P. spinulosum*, *P. thomii* e *P. verruculosum*. Dos solos, o seco apresentou maior diversidade de espécies de *Penicillium*, em relação ao típico de mata.

Em 2007, Gomez et al. estudaram a diversidade de fungos, presentes em solos na Argentina com desmatamento da vegetação nativa para realização de diferentes manejos. As coletas foram realizadas durante três anos. Dentre os gêneros isolados, *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais frequentes, ocorrendo em todas as coletas, inclusive no solo controle. Do gênero *Penicillium*, em nível de espécie, apenas *P. purpurogenum* foi identificado.

Kurek et al. (2007) avaliaram as comunidades de fungos filamentosos presentes em solo de tundra ártica e os caracterizaram quanto a capacidade de crescer em baixas temperaturas. Foram obtidos isolados pertencentes a 17 gêneros, sendo a maioria das espécies representantes dos gêneros *Chrysosporium*, *Mortierella*, *Penicillium* e *Phialophora*. A metade dos isolados eram psicrófilos. Do gênero *Penicillium* foram isolados *P. lanosum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. verrucosum*, *P. cyclopium* e *P. islandicum*.

Avaliando a diversidade fúngica do solo em ambientes ripários com diferentes formas de manejo no Rio Grande do Sul, Prade (2007) isolou e identificou 28 espécies de fungos, onde foram identificados *P. citrinum* e *P. digitatum*.

Grishkan et al. (2008), avaliando comunidades de fungos presentes em solos cultivados e não cultivados da Alta Galiléia em Israel, encontraram *P. simplicissimum*,

como espécie dominante em ambos os solos. Os autores concluíram que a atividade agrícola prolongada na região pode diminuir a diversidade de fungos.

Em 2010, Asan et al. isolaram fungos filamentosos do ar e solo de Luleburgaz/Kirklareli, Turquia, com intervalos sazonais. Do ar, o gênero mais representativo foi *Alternaria* e do solo *Penicillium* com 15 espécies, sendo *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. corylophilum*, *P. decumbens*, *P. corylophilum*, *P. decumbens*, *P. glabrum*, *P. melinii*, *P. miczynskii*, *P. ochrochloron*, *P. oxalicum*, *P. paxilli*, *P. purpurogenum*, *P. restrictum*, *P. simplicissimum* e *P. waksmanii*.

No Brasil, Coutinho et al. (2010), ao isolarem fungos filamentosos da rizosfera de meloeiros (*Cucumis melo* L. cv. Gold Mine) cultivados em solo com compostos orgânicos na região do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, encontraram 78 espécies, sendo os gêneros mais representativos *Aspergillus* e *Penicillium*, com 15 e 13 espécies, respectivamente. Foram identificados *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. decumbens*, *P. dierckxii*, *P. griseofulvum*, *P. janthinellum*, *P. pinophilum*, *P. waksmanii*, *P. restrictum*, *P. solitum* var. *crustosum*, *P. spinulosum* e *P. vinaceum*.

Na República Tcheca, Hujšlová et al. (2010) avaliaram a diversidade de fungos filamentosos em solo ácido da Reserva Natural Nacional. Foram avaliadas 28 amostras de solo e obtidas 92 espécies identificadas através de marcadores moleculares. Do gênero *Penicillium* foram confirmadas 17 espécies (*P. alii*, *P. brevicompactum*, *P. charlesii*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. coprobium*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. montanense*, *P. piceum*, *P. purpurogenum*, *P. purpurogenum*, *P. rubrisclerotium*, *P. roseopurpureum*, *P. simplicissimum* e *P. spinulosum*).

Da Silva et al. (2011) desenvolveram um estudo com o objetivo de isolar e identificar fungos do solo de sistemas agroflorestais e avaliar a atividade enzimática desses fungos. Foram identificadas onze espécies de fungos anamorfo (Hyphomycetes) distribuídos em cinco gêneros: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Penicillium*.

Demirel, (2013) em seu estudo, isolou a partir de 56 amostras de solo da província de Eskişehir, nove espécies *Penicillium* de terverticillados (*P. griseofulvum*, *P. puberulum*, *P. crustosum*, *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. primulinum*, *P. expansum*, *P. viridicatum*, *Eupenicillium egyptiacum*). Essas espécies foram

caracterizadas geneticamente por PCR. Os resultados indicaram que a identificação de espécies de *Penicillium* baseada em métodos de PCR forneceu informações significativas para a taxonomia do gênero e dá mais robustez aos resultados.

Song(2015), com o objetivo de isolar e identificar os micro-organismos solubilizadores de moscovite, e explorar o mecanismo de extração de potássio pelos por deles, utilizou dez estirpes isoladas do solo da província de Anhui, China. Os quatro melhores micro-organismos solubilizadores de moscovite foram identificadas como *Penicillium purpurogenum*, *Talaromyces radicus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aureobasidium pullulans*.

2.4.2 Avanços na Taxonomia de *Penicillium*

Na história do gênero *Penicillium*, 140 anos após a descrição do gênero por Link, foi publicado em 1949 o “Manual of the Penicillia” de Raper; Thom, no qual propuseram 137 espécies, baseados em características macroscópicas, como textura da colônia, características microscópicas e fisiológicas, como temperatura, pigmentação e desenvolvimento em meios de cultura padrões. Segundo os autores, espécies de *Penicillium*, geralmente crescem utilizando uma ampla diversidade de monossacarídeos, dissacarídeos, álcool e ácidos como única fonte de carbono. Trealose e polióis como o manitol são compostos importantes, frequentemente armazenados nas hifas e conídios. A maioria das espécies consegue crescer com nitrato como única fonte de nitrogênio, embora o crescimento seja acelerado com a adição de peptona. Além de carbono e nitrogênio outros elementos podem ser mobilizados a partir de fontes inorgânicas. Muitas espécies de *Penicillium* não exigem vitaminas complexas para crescerem.

Pitt (1979) descreveu 150 espécies, estimando que possa haver cerca de 300 espécies para o gênero, enquanto Ramirez (1982) utilizou 400 nomes para a mesma série de organismos listados por Pitt e publicou seu Manual e Atlas do Penicillia. Ele contém descrição de 227 espécies e variedades de *Penicillium*. De acordo com Pitt, cerca de 1000 fenótipos diferentes ainda foram catalogados. Pitt (1991) catalogou as espécies mais comuns na natureza, afirmando que cerca de 30 a 40 são comuns. Em 2000, Pitt et al. listaram 225 espécies aceitas para *Penicillium*, com seus respectivos sinônimos.

Devido à elevada diversidade do gênero e sua semelhança morfológica, a taxonomia do mesmo torna-se complexa e muitas vezes análises morfológicas e fisiológicas são insuficientes para a classificação de isolados de *Penicillium*. Faz-se necessário o uso de ferramentas que venham a auxiliar a taxonomia clássica como a análise de DNA. Através da biologia molecular, e outras técnicas que complementem uma abordagem polifásica pode-se chegar mais perto de uma identificação mais confiável das espécies do gênero.

As tubulinas são as principais proteínas constituintes dos microtúbulos, sendo estes responsáveis pela formação do citoesqueleto. São encontradas em todos os eucariotos e exercem um papel crítico em vários processos celulares, tais como a motilidade celular, transporte citoplasmático e divisão celular (Stotz; Long, 1999). De acordo com Tuszynski et al. (2006), tanto a sequência de nucleotídeos do gene β -tubulina, quanto a sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene, têm sido extensivamente usadas para estimar as relações filogenéticas em fungos. Os resultados dessas análises são importantes para a estimativa e análise de parentesco entre os organismos e são indispensáveis ao entendimento de processos evolutivos.

Em abril de 2007, foi realizado um seminário internacional, ocorrido em Utrecht, Holanda, onde uma comissão de especialistas em *Aspergillus* e *Penicillium* estabeleceu recomendações para publicações de espécie novas dos dois gêneros. Foi estabelecido que para propor qualquer espécie nova deve-se mostrar evidência de divergência evolutiva de espécies, bem como morfologia e extrólitos distintivos; devem ser fornecidas informações detalhadas quanto à morfologia e fisiologia, baseadas em crescimento sobre o meio de cultura padrão (Ágar Extrato de Malte para *Penicillium* e Ágar Czapek para *Aspergillus*); a cultura tipo deve ser incorporada a duas Coleções de Cultura internacionais; a análise molecular de pelo menos dois “loci” gênicos diferentes, tais como RNA polimerase, actina, β -tubulina e calmodulina; as sequências gênicas devem ser depositadas em bancos de dados. Dentre essas exigências, no que diz respeito à análise molecular, as regiões β -tubulina e calmodulina são frequentemente utilizadas, existindo grandes conjuntos de informações em bancos de dados (Samson et al., 2007).

Samson et al. (2004) avaliaram sequências parciais do gene β -tubulina, de 180 isolados de espécies de *Penicillium*, pertencentes ao subgênero *Penicillium*. A estrutura filogenética geral foi determinada por uma análise de parcimônia com cada espécie

representada pela espécie tipo, ou outra identificada de forma confiável. De acordo com os autores, as sequências de β -tubulina foram excelentes marcadores de espécies, relacionando-se bem com as características fenotípicas.

Houbraken et al. (2010), analisaram isolados de *Penicillium citrinum* e espécies afins, estocadas na Coleção de Culturas Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), através de biologia molecular, com a amplificação parcial e posterior sequenciamento do gene para β -tubulina, calmodulina e regiões ITS, além de padrão de extrólitos e caracteres fenotípicos. Os isolados analisados foram provenientes de vários substratos como, solos de diferentes locais, alimentos e ar. Dentre eles, *P. citrinum*, (15); *P. gorlenkoanum*, (dois); *P. hetheringtonii*, (quatro); *P. sizovae*, (sete); *P. steckii*, (nove); *P. tropicoides*, (dois) e *P. tropicum*, (um). Os dados moleculares revelaram que seis espécies estão relacionadas com *P. citrinum*, quatro delas, *P. hetheringtonii*, *P. gorlenkoanum*, *P. sizovae* e *P. steckii*, são estritamente anamorfos e duas formam um teleomorfo, *P. tropicoides* e *P. tropicum*. Concluíram que sete espécies pertencem a série *Citrina*. *Penicillium sizovae* e *P. steckii* estão relacionados com *P. citrinum*. *Penicillium gorlenkoanum* foi revisado, *P. hetheringtonii* e *P. tropicoides* foram descritos como espécies novas.

Em 2014, Samson, Visagie e Houbraken publicaram um livro sobre a diversidade das espécies em *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*. Onde de 49 espécies 18 eram novas para o gênero *Penicillium* e que foram descritos como novas.

Em 2015, Refai publicou trabalho de revisão e compilação com 354 espécies aceitas para o gênero, inseridas em dois subgêneros e 226 seções.

De acordo com Pitt (1991) os teleomorfos são reconhecidos como gêneros separados. Espécies de *Penicillium* são associadas com dois gêneros teleomorfos de Ascomycetes: *Eupenicillium* Ludwig e *Talaromyces* C. Benjamin, que são filogeneticamente e taxonomicamente bastante distintos. Ainda em 1985, o mesmo autor formalizou o reconhecimento de quatro subgêneros, *Aspergillus*, *Furcatum*, *Penicillium* e *Biverticillium*. Nos últimos anos tem crescido a proposta que *Penicillium* subgênero *Biverticillium* é filogeneticamente distinto de outros subgêneros de *Penicillium* e que esta distinção deve ser refletida na sua taxonomia formal.

Maloch (1985), baseado na consideração de fatores morfológicos e ecológicos, e conexões anamorfo-teleomorfo, pode ter sido o primeiro a especular que o subgenero

Biverticillium deveria ser removido de *Penicillium* e agrupado separadamente. Uma vez que estudos baseados no DNA de fungos começaram, a filogenia, rapidamente tornou-se evidente o agrupamento dicotômico do subgênero *Biverticillium* em relação ao gênero como um todo.

Samson et al., (2011) realizaram um estudo para complementar conclusões anteriores que *Talaromyces* e subgênero *Biverticillium* compreendem um grupo monofilético que é distinto de *Penicillium* a nível de gênero, dentro da família *Trichocomaceae*. A partir do sequenciamento da região ITS (incl. 5.8S rDNA) de alguns isolados representativos de espécies de *Talaromyces* e anamórficas biverticilladas. Como resultado, observaram que espécies *Talaromyces* e a maioria das espécies de *Penicillium* subgênero *Biverticillium* se agruparam em um clado monofilético distante de espécies de outros subgêneros de *Penicillium*. Perfis de extrólitos também foram compilados e todas as evidências apoiam que *Penicillium* subgênero *Biverticillium* é distinto de outros subgêneros em *Penicillium* e deveria ser taxonomicamente unificado com as espécies de *Talaromyces* que residem no mesmo clado. A partir de então todas as espécies aceitas de *Penicillium* subgênero *Biverticillium* foram transferidas para *Talaromyces*. Espécies de importância biotecnológica e médica, tais como *P. funiculosum* e *P. marneffei*, agora são combinadas em *Talaromyces*.

Em 2014, Yilmaz realizou estudo com o objetivo de aplicar uma identificação polifásica sobre o gênero *Talaromyces*. No seu trabalho, utilizou caracteres morfológicos, fisiológicos e moleculares. E baseado em ITS, BenA e RPB2, propuseram uma nova classificação para o gênero, colocando as 88 espécies aceitas em sete seções, seções nomeadas *Bacillispori*, *Helici*, *Islandici*, *Purpurei*, *Subinflati*, *Talaromyces* e *Trachyspermum*.

2.5 Enzimas ligninolíticas

Espécies de *Penicillium* podem produzir enzimas para atuar ativamente no processo de reciclagem de matéria orgânica e estabelecer uma vantagem competitiva em

relação às demais que ocupam o mesmo habitat (Belmares et al., 2004; Pinto et al., 2005). Logo, o gênero apresenta-se como um bom produtor, pois com o crescimento dos processos biotecnológicos, despertou-se o interesse pela importância das enzimas produzidas por micro-organismos.

As enzimas produzidas por micro-organismos, apresentam algumas vantagens, como: aplicação de materiais recalcitrantes, a operação em altas e baixas concentrações de contaminantes ao longo de uma ampla faixa de pH, de temperatura e salinidade, as necessidades de aclimação da biomassa, o curto tempo de produção, a contínua produção, o processo fermentativo não demanda muito espaço e a possibilidade de utilização de substratos de baixo custo (Duran & Esposito, 2000; Maciel, 2010). E ainda podem ser aplicadas, em grande escala, na industrialização de detergentes, amido, bebidas, alimentos, têxtil, alimentação animal, polpa, papel, produtos químicos, couro, produtos biomédicos, na degradação de xenobióticos e na biorremediação (Guimarães et al., 2006; Souza et al., 2008). Espécies de *Penicillium* já tem sido relatadas como produtoras de diversas enzimas de interesse industrial, entre elas estão as enzimas do complexo ligninolítico (Boonchan et al., 2000).

As maiores famílias de enzimas lignolíticas produzidas por fungos são manganês peroxidase (MnP) (E.C.1.11.1), lacases (Lac) (E.C.1.10.3.2) e lignina peroxidase (LiP) (E.C.1.11.1.14), sendo as duas ultimas as mais importantes nos processos de degradação de lignina (D'Souza et al., 2006). A lignina é o segundo polímero aromático mais abundante na natureza com estrutura tridimensional composta por unidades aromáticas de fenilpropano (Praveen et al., 2011) e tem um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo responsável pela resistência mecânica de vegetais, além de proteger os tecidos contra o ataque de micro-organismos. E devido a sua complexidade, a sua degradação exige um processo oxidativo mediado por enzimas lignolíticas (Carvalho et al., 2009).

Enzimas lignolíticas são oxidoredutases, estão inseridas no sistema enzimático fenoloxidase e apresentam uma larga aplicação nas indústrias. A falta à especificidade pelo substrato é o que confere ao complexo ligninolítico habilidade na degradação de diversos xenobióticos, com aplicação na indústria química, alimentícia, agrícola, de papel, têxtil, além de setores da indústria de cosméticos (Bonugli-Santos et al., 2010; Gomes, et al., 2008; De Souza; Peralta, 2003). Fungos produtores de enzimas

ligninolíticas apresentam grande potencial para serem usados em muitos processos de biorremediação, como o tratamento de poluentes. O potencial de aplicação de enzimas ligninolíticas tem sido alvo de grande interesse acadêmico e industrial, devido à sua capacidade de biodegradar uma série de poluentes tóxicos e recalcitrantes, diante disto, fungos produtores de enzimas ligninolíticas apresentam grande potencial para serem usados em muitos processos de biorremediação - alternativa ecologicamente mais segura e eficiente para reduzir a poluição por contaminantes orgânicos quando comparada com processos químicos e físicos (Baptista, 2011; Ward *et al.*, 2003).

2.5.1 Lacase

A lacase foi observada pela primeira vez no exsudato de *Rhus vernicifera* (árvore japonesa) e só anos mais tarde foi observada em fungos (Baldrian, 2006). Já foram relatadas sendo produzidas por Ascomycetes, Deuteromycetes e Basidiomycetes (Shraddha *et al.*, 2011). São enzimas que reduzem o oxigênio molecular à água e, simultaneamente, realizam oxidação de elétrons de vários substratos, como polifenóis, diaminas e alguns compostos inorgânicos (Thurston, 1994; Piontek *et al.*, 2002). A ação da lacase é garantida pela presença de diferentes sítios de cobre presentes na enzima. (Baldrian, 2006).

A lacase também pode atuar em substratos não fenólicos através da inclusão de mediadores redox - grupo de compostos orgânicos de baixo peso molecular que pode ser oxidado pela lacase formando cátion altamente ativo capaz de oxidar compostos não fenólicos que a lacase naturalmente não poderia oxidar. Os mediadores sintéticos mais comuns são HBT (1-hidroxibenzotriazol), ABTS (2,2'-azido-bis ácido-3-etilbeniltioazol-6-sulfônico), VLA (Ácido violúrico) e TEMPO (tetrametil-piperidina-óxido) (Silva *apud* Tavares, 2006; Brijwani *et al.*, 2010).

A capacidade das lacases fúngicas de catalizar diferentes substratos proporciona um grande número de aplicações biotecnológicas, entre elas a descoloração e detoxificação de corantes têxteis e efluentes, deslignificação de celulose, produção de etanol, a remoção de compostos fenólicos de vinhos e outras bebidas, transformação de antibióticos, esteróides e muitos compostos aromáticos (Silva *apud* D'Souza-Ticlo *et al.*, 2009).

2.5.2 Manganês peroxidase

Manganês peroxidase (MnP) é uma enzima extracelular do tipo glicoproteína, que depende de peróxido de hidrogênio e da disponibilidade de íons manganês para sua atividade. Foi observada a primeira vez em *Phanerochaete chrysosporium* (Martinez *et al.*, 1996). As enzimas manganês peroxidases catalisam a oxidação de uma grande variedade de substratos naturais e sintéticos (Gianfreda; Bollag, 2002). O extraordinário potencial de degradação da manganês peroxidase não é limitado a lignina, a MnP também pode atuar em substâncias derivadas da lignina, tais como substâncias húmicas, como organopoluentes diversos, incluindo xenobióticos persistente. A MnP está entre as enzimas mais comuns que apresentam o maior potencial para aplicações industriais, pois nestas enzimas, assim como, na lacase e lignina peroxidase falta especificidade por um substrato (De Souza; Peralta, 2003).

2.5.3 Lignina peroxidase

A lignina peroxidase é uma glicoproteína dependente de peróxido de hidrogênio e que em seu sítio ativo contém ferro. A lignina peroxidase tem um elevado potencial de oxidação e pode oxidar substratos fenólicos e não fenólicos (Baptista, 2011).

Uma característica deste grupo de enzimas é a sua ocorrência como uma grande família de isoenzimas, que catalisam uma variedade de compostos fenólicos, não fenólicos e outros compostos resistentes à degradação microbiana. Este processo catalítico ocorre pela oxidação de elétrons seguida de reações não enzimáticas (Gianfreda; Bollag, 2002).

A descoberta da lignina peroxidase foi um grande avanço na compreensão do mecanismo de degradação da lignina e são consideradas como alternativa biológica promissora para a remoção de compostos tóxicos do ambiente. O principal exemplo é a atuação da LiP na indústria têxtil, que gera efluentes altamente complexos e recalcitrantes (Kunz *et al.*, 2002).

O álcool veratrílico, um metabólito produzido por e por outros fungos da podridão branca sob condições ligninolíticas, desempenha um papel importante no ciclo

catalítico da LiP. Ele atua como redutor da enzima e aparentemente a protege da inativação por excesso de H_2O_2 . A oxidação do álcool veratrílico para veratraldeído pela LiP, na presença de H_2O_2 , é a reação mais utilizada como método de determinação da atividade catalítica da enzima (Tien & Kirk 1984).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Conhecer a diversidade de espécies de *Penicillium* isoladas de solos de ecossistemas de áreas de Mata Atlântica da Reserva Ecológica de Saltinho, Pernambuco, Brasil, e avaliar um representante de cada espécie isolada quanto à capacidade de produzir enzimas do complexo ligninolítico.

3.2 Específicos

- Isolar e identificar, através da taxonomia clássica e biologia molecular, espécies de *Penicillium* de amostras de solos de ecossistemas de área de Mata Atlântica sensu latu, restinga, tabuleiro e manguezal;
- Conhecer e comparar a frequência de ocorrência, abundância relativa, riqueza, diversidade e similaridade das espécies de *Penicillium* isoladas dos três diferentes ecossistemas de Mata Atlântica;
- Avaliar um representante de cada espécie quanto à capacidade de produzir enzimas do complexo ligninolítico (lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase);

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A Reserva Biológica de Saltinho está situada na mesoregião da Mata Atlântica pernambucana, localizada a 100 km do Recife, abrangendo os Municípios de Tamandaré e Rio Formoso (8°43'09''S e 8°44'13''S, 35°10'11''W e 35°11'02''W, respectivamente). O clima está caracterizado como úmido (As') segundo Koppen, com temperatura média anual de 25°C. O período chuvas ocorre o ano todo com períodos de seca nos meses outubro, novembro e dezembro, com precipitações médias anuais de 1.500 a 2.000 mm. Os tipos de solos predominantes na reserva são Latissolo, Argissolo e Gleissolo (IBAMA, 2003). Sua vegetação remanescente de Mata Atlântica é predominante composta por florestas ombrófilas. O seu domínio fitogeográfico é diversificado principalmente na Área de Proteção Ambiental (APA) de Guadalupe, que envolve a Reserva Biológica de Saltinho (REBIO), onde são observadas zonas florestais, zonas de tabuleiros, zonas de restingas e zonas de manguezais, podendo ser separada em zonas de matas e zonas estuarinas (IBAMA, 2003; Rodrigues et al., 2007).

Os ecossistemas de restingas apresentam uma comunidade biológica diversificada, em reflexo ao grau de exposição às brisas marinhas e ao tipo de solo (Sampaio et al., 2005). A vegetação de restinga pode variar em fisionomia desde o tipo herbáceo praiano até o arbóreo fechado, onde plantas como *Remirea maritima* Aubl. e *Canavalia rosea* (Sw.) são encontradas.

Os manguezais são ecossistemas expostos a condições de extrema salinidade, sendo considerados sistemas intermediários aquáticos e terrestres. Apresentam em sua composição *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae), seguido de *Laguncularia racemosa* (Combretaceae) e *Avicennia* spp. (Acanthaceae) (Castiglioni e Coelho, 2011).

O tabauleiro é um ecossistema que se desenvolve a margem da floresta atlântica, apresenta ocorrências de espécies vegetais do cerrado em áreas de solo arenoso próximo ao litoral. Sua vegetação surge em áreas abertas em enclaves costeiros (Almeida et al., 2006).

4.2 Coleta do solo

Foram realizadas três coletas de solo, no entorno da REBIO Saltinho, a APA de Guadalupe, em três áreas de ecossistemas diferentes: restinga, tabuleiro e manguezal. Em cada área foram distribuídos aleatoriamente três quadrantes de 25 m² (5 x 5 m) respeitando uma distância mínima de 10 m entre eles. Em cada quadrante foram coletadas seis subamostras de solo em pontos equidistantes a uma profundidade de 20 cm, totalizando 18 subamostras de solo para cada área, 54 considerando-se as três áreas. As mesmas foram acondicionadas em sacos plásticos e conservadas em caixas de isopor com gelo durante o transporte. No laboratório, foram homogeneizados volumes iguais das três subamostras de cada quadrante de coleta originando uma amostra composta por quadrante, totalizando seis amostras compostas por área de coleta. No total, foram analisadas 18 amostras compostas de solo por coleta.

4.3 Isolamento dos Fungos

Para o isolamento dos fungos, uma suspensão do solo coletado foi feita segundo o método de Warkup (1950) modificado, com o seguinte procedimento: 25 g de cada amostra do solo foram suspensos em 225 mL de água destilada esterilizada e o sistema foi agitado durante alguns minutos. Desta suspensão, 10 mL foi adicionado a 90 mL de água destilada esterilizada (1:100) e a operação foi repetida para obtenção das diluições 1:1000 e 1:10000. De cada diluição, 1 mL foi espalhado na superfície dos meios Sabouraud acrescido de coranfenicol (2%) contidos em placas de Petri. As placas permaneceram à temperatura ambiente (28 °C ± 1 °C) por 72 horas.

4.4 Purificação e identificação das espécies de *Penicillium*

Para a purificação das amostras fúngicas, fragmentos das colônias foram transferidos para o meio de cultura Ágar Extrato de Malte (MEA), contido em placas de Petri e o crescimento acompanhado por 72 horas. Após confirmada a pureza, as amostras fúngicas foram transferidas para o mesmo meio de cultura.

Para a identificação dos fungos foram observadas características macroscópicas (coloração, aspecto e diâmetro das colônias) e microscópicas (microestruturas somáticas e reprodutivas) conforme Pitt, (1991); Samson e Frisvad, (2004). Os esporos de cada um dos isolados de *Penicillium* foram suspensos em 1,0 mL de uma solução contendo 0,2 % de ágar e 0,05 % de Tween 80. Desta suspensão, 2,0 µL foram utilizados para

inoculação em três pontos das placas de Petri contendo 25 mL dos meios de cultura Ágar Czapek Levedura (CYA), Ágar Extrato de Malte (MEA) e 25% Ágar Glicerol (G25N). A incubação ocorrerá a 5°C, 25°C e 37°C para CYA e a 25°C para MEA e G25N por sete dias. As características microscópicas de cada espécie foram registradas através de fotografias em microscopia de luz (Carl Zeiss Axiostar Plus). Por fim, todos os isolados foram adicionados ao Catálogo de Micoteca - URM (WDCM604).

Para a identificação das amostras de *Penicillium* utilizando técnicas moleculares, foi utilizado um representante de cada espécie. A extração do DNA genômico foi realizada conforme Góes-Neto et al. (2005), que inclui uma lavagem com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) do micélio previamente triturados em tampão CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) 2%, além de precipitação em isopropanol, lavagem em etanol 70% e ressuspensão em 50 µL de água ultrapura.

As regiões ITS1 e ITS2 foram amplificadas utilizando os iniciadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') como descrito por White et al. (1990). A amplificação parcial do gene β -tubulina foi realizada utilizando os iniciadores Bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT TTC 3') e Bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3') (Glass & Donaldson, 1995). Posteriormente as amostras foram enviadas para o sequenciamento na Plataforma Tecnológica de Genômica e Expressão Gênica do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco.

Os eletroferogramas foram analisados e editados no software Staden Package 2.0 (Staden et al. 1998) e as sequências obtidas foram utilizadas para busca das mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn. As sequências experimentais da região ITS e do gene da β -tubulina foram alinhadas e editadas em conjunto com as recuperadas da base de dados utilizando o programa MEGA 6 (Tamura et al 2011). Árvores filogenéticas do gênero *Penicillium* foram construídas através do método máxima verossimilhança com 1000 reamostragens de *bootstrap* usando o programa MEGA 6 (Tamura et al., 2011).

4.5 Análise ecológica

A análise estatística da diversidade de espécies de *Penicillium* nas três áreas foi realizada utilizando o índice de Shannon. A abundância foi calculada de acordo com Magurran (1988) e equitabilidade foi quantificada pelo índice de Pielou (Pinto-Coelho, 2002). Dominância relativa foi dada pela equação $DA = NA / NA + NB + NC \dots NN \times 100$, onde DA significa dominância das espécies, e $NA + NB + NC \dots NN$ significa o número de indivíduos de espécies A, B, C.... N. A similaridade-dissimilaridade de espécies de *Penicillium* entre as amostras de solo dos diferentes ecossistemas foi testada com base na distância de Bray-Curtis que varia de 0 (similaridade) a 1 (dissimilaridade), utilizando-se a matriz de densidade das espécies (Pinto-Coelho, 2002).

4.6 Seleção de isolados de *Penicillium* quanto à produção de enzimas ligninolíticas em meio de cultura líquido

Foi selecionado pelo menos um isolado de cada espécie que ocorreu em cada uma das áreas estudadas e as linhagens foram cultivadas em meio de cultura Extrato de Malte durante 7 dias a 30°C. Em frascos de Erlenmeyers foi preparado o meio basal de Bonugli-Santos et al., (2010), tendo como substrato farelo de trigo. Após a esterilização dos frascos foi realizado inóculo de uma suspensão de esporos anteriormente preparada com as culturas fúngicas. O material foi incubado a 28°C por sete dias de forma estática. Após esse período de cultivo, os meios de cultura foram filtrados em papel de filtro Whatman nº 1 e centrifugados a 12.300 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado na determinação das atividades ligninolíticas.

4.7 Métodos analíticos

Todas as atividades foram expressas em U/L.

4.7.1 Atividade de lacase

A atividade de lacase foi quantificada por espectrofotômetro, a partir da oxidação do 2,2-azino-bis-ethylbenthiazolina (ABTS), pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm. Utilizou-se 0,8 mL de ABTS (0,03% v/v), 0,1 mL de tampão acetato de sódio e 0,1 mL do extrato enzimático (Arora; Gil, 2002).

4.7.2 Atividade de lignina peroxidase (LiP)

A quantificação da lignina peroxidase foi avaliada por espectrofotometria (310 nm) a partir do aldeído veratrílico produzido na oxidação do álcool veratrílico usado como substrato. A mistura reacional continha 1mL de tampão tartarato de sódio 125 mM pH 3,0; 500 µL de álcool veratrílico 10 mM; 500 µL de peróxido de hidrogênio 2 mM; 500 µL de extrato enzimático (Bonugli-Santos et al., 2010).

4.7.3 Atividade de manganês peroxidase

A quantificação de manganês peroxidase foi medida a 610 nm utilizando a metodologia descrita por Kuwahara et al., (1984). A mistura reacional (1 mL) continha extrato enzimático (500 µL), vermelho de fenol (100 µL), lactato de sódio 250 mM (100 µL), albumina bovina 0,5% p/v (200 µL), sulfato de manganês 2 mM (50 mL) e peróxido de hidrogênio 2 mM (50 mL) preparado em tampão succinato de sódio 20 mM, pH 4,0. As reações ocorreram a 30°C, durante 5 minutos e foram interrompidas pela adição de NaOH 2 N (40µL).

Para todas as enzimas uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1µmol de substrato por minuto. A atividade específica foi expressa em unidades por mg de proteína. Todos os valores apresentados foram médias de três repetições.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Taxonomia clássica e Biologia Molecular

No total foram obtidos 227 linhagens de *Penicillium* do solo de Mata Atlântica de Pernambuco, destes, 75 foram isolados de solo de manguezal, 86 de tabuleiro e 66 de restinga (Tabela 1). Ao todo, foram identificadas oito espécies, sendo: *Penicillium wotroi* Houbraken, López-Quintero, Frisvad & Samson 2011; *P. herquei* Bainier & Sartory 1912; *P. singorense* Visagie, Seifert & Samson 2014; *P. simplicissimum* Thom 1930; *P. citrinum* Thom 1910; *P. sclerotiorum* J.F.H. Beyma 1937; *P. toxicarium* Miyake 1940 e *P. expansum* Link 1809 e três *Talaromyces* (antes, *Penicillium*), sendo: *T. verruculosus* (Peyronel) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert 2011; *T. cnidii* S.H. Yu, T.J. An & H.K. Sang 2013 e *T. pnophilum* (Hedgc.) Samson, N. Yilmaz, Frisvad &

Seifert 2011. Trata-se da primeira ocorrência na América do Sul para *Penicillium wotroi*, *P. singorense* e *Talaromyces cniddi*. Das espécies de *Penicillium* obtidas no presente estudo, 5 são predominantemente monoverticiladas e 3 predominantemente biverticiladas. As características macroscópicas e microscópicas das espécies de *Penicillium* estão escritas na Tabela 1. Um representante de cada espécie foi incorporado ao acervo da Coleção de Culturas- Micoteca URM, sob os métodos de preservação sob óleo mineral, liofilização e ultracongelamento a -80°C (Sherf, 1943; Raper; Alexander; 1945; Kirsop; Doyle, 1991).

Tabela 1. Características macroscópicas e microscópicas das espécies de *Penicillium* isoladas de solo de Mata Atlântica.

Espécie	Textura e Aparência	Conidióforo - Padrão de ramificação	Estipe (μ)	Métulas (μ)	Fiálides (μ)	Conídios (μ)	Outro
<i>Penicillium wotroi</i> Houbraken, López-Quintero, Frisvad & Samson 2011	Velutínea	Biverticilado	288	16.8	2.4	2.4	-
<i>P. herquei</i> Bainier & Sartory 1912	Velutínea e plana	Biverticilado apresentando também terverticilado	288	14.4	9.6	2.3	Râmulo 31.2 μ
<i>P. singorense</i> Visagie, Seifert & Samson 2014	Flocosa sulcada	Monoverticilado à biverticilado	36	-	6	2.3	Vesículas 2-3 μ
<i>P. simplicissimum</i> Thom 1930	Velutínea e radialmente sulcada	Monoverticilado a apresentando também biverticilado	288	16.8	2.4	2.6	-
<i>P. citrinum</i> Thom 1910	Velutínea e radialmente sulcada	Monoverticilado apresentando também biverticilado	288	16.8	2.4	2.6	-
<i>P. sclerotiorum</i> J.F.H. Beyma 1937	Velutínea e radialmente sulcada	Monoverticilado	120	-	2.4	2.4	vesiculado
<i>P. toxicarium</i> Miyake 1940	Velutino e levemente sulcada	Monoverticilado	120	-	6.0	2.3	-
<i>P. expansum</i> Link 1809	Velutínea e plana	Biverticilado apresentando também terverticilado	288	14.4	9.6	2.3	Râmulo 31.2 μ
<i>Talaromyces nidii</i> S.H. Yu, T.J. An & H.K. Sang 2013	Velutino	Biverticilado simétrico	240	12	14.4	2.3	
<i>T. pnophilus</i> (Hedgc.) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert 2011	Plana e flocosa	Biverticilado simétrico	300	12	9.6	2.3	-
<i>T. verruculosus</i> (Peyronel) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert 2011	Velutínea e plana	Biverticilado simétrico	180	16.8	6.0	3.0	-

Dentre os isolados identificados morfológicamente, foi selecionado pelo menos um isolado de cada espécie que ocorreu em cada uma das áreas estudadas para sequenciamento da região ITS e β -tubulina do rDNA. Dos 29 isolados foram identificados 11 espécies conforme figura 7.

Apesar de algumas divergências das entre a morfologia e os dados da biologia molecular, foram encontrados altos índices de identidade, e priorizadas as sequência com índice superior a 98%. Nilsson et al. (2008) apontaram que 2% é uma margem aceitável para divergências intraespecíficas em Ascomycota para sequências da região ITS e β -tubulina do rDNA, o que corrobora com os resultados encontrados.

Segundo Pitt (1991), *Penicillium* apresenta grande dificuldade taxonômica, sobretudo pelo elevado número de espécies e pela semelhança morfológica entre as mesmas. Devido a elevadas similaridades macroscópicas e microscópicas entre espécies, ao nível do gênero, as análises morfológicas são, por vezes, insuficientes para a classificação de isolados de *Penicillium*. Por isso, torna-se necessária a utilização de ferramentas tais como a biologia molecular, de modo a garantir o sucesso na identificação ao nível de espécies.

Samson et al. (2004) avaliaram sequências parciais do gene β -tubulina, de 180 isolados de espécies de *Penicillium*, pertencentes ao subgênero *Penicillium*. A estrutura filogenética geral foi determinada por uma análise de parcimônia com cada espécie representada pela espécie tipo, ou outra identificada de forma confiável. De acordo com os autores, as sequências de β -tubulina foram excelentes marcadores de espécies, relacionando-se bem com as características fenotípicas.

Demirel et al., (2013) isolaram de amostras de solo nove espécies de *Penicillium* terverticillados (*P. griseofulvum*, *P. puberulum*, *P. crustosum*, *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. primulinum*, *P. expansum*, *P. viridicatum*, *Eupenicillium egyptiacum*) e caracterizou-as geneticamente através do método de PCR com o ITS e ITS4 iniciadores específicos de fungos universais. Os resultados indicaram que a identificação de espécies de *Penicillium* utilizando métodos de PCR forneceu informações significativas para a solução da complexidade taxonômica do gênero.

Devido às limitações associadas com o ITS como marcador para espécies de *Penicillium*, um marcador secundário é muitas vezes necessário para a identificação de isolados ao nível de espécie. Segundo Samson et al., (2014), um marcador secundário

deve atender os seguintes requisitos: ser fácil para amplificar, distinguir entre espécies intimamente relacionadas e ter um conjunto de dados de referência. Levando isso em consideração estes critérios, lançaram como proposta o uso de β -tubulina (BenA) como melhor opção de marcador secundário de identificação para *Penicillium*. Assim, para identificações rotineiras BenA é atualmente recomendado, enquanto que para a descrição de novas espécies, a literatura sugere o uso de ITS, BenA, CAM e RPB2 entre os marcadores para multilocus digitação sequência e GCPSR. Incluir pelo menos sequências de BenA ao descrever novas espécies é uma boa prática, para permitir que outros pesquisadores reconheçam mais facilmente a nova espécie.

Davolos et al., (2013) estudando a morfologia de isolados de *Penicillium* idênticos fenotipicamente exibido características macro e microscópicas que eram semelhantes a porém não completamente atribuível a *Penicillium raistrickii*, realizaram uma abordagem baseada na análise de sequenciamento de DNA utilizando a região K(ITS1-5,8S-ITS2), domínios D1 e D2 do rDNA 28S, uma região do gene da cadeia beta tubulina (benA) e parte do gene da calmodulina (TMC) que foram amplificados por PCR e sequenciados. Como resultados descreveram e nomearam a nova espécie *Penicillium simile* filogeneticamente diferente do *P. raistrickii*.

Para nossos resultados algumas linhagens necessitam de análises de outros genes para uma melhor robustez dos dados. As linhagens que apresentaram divergência entre os resultados da identificação morfológica e a identificação molecular, necessitam de novas análises morfológicas e/ou moleculares, com a análise de outras regiões do DNA, visando resultados conclusivos.

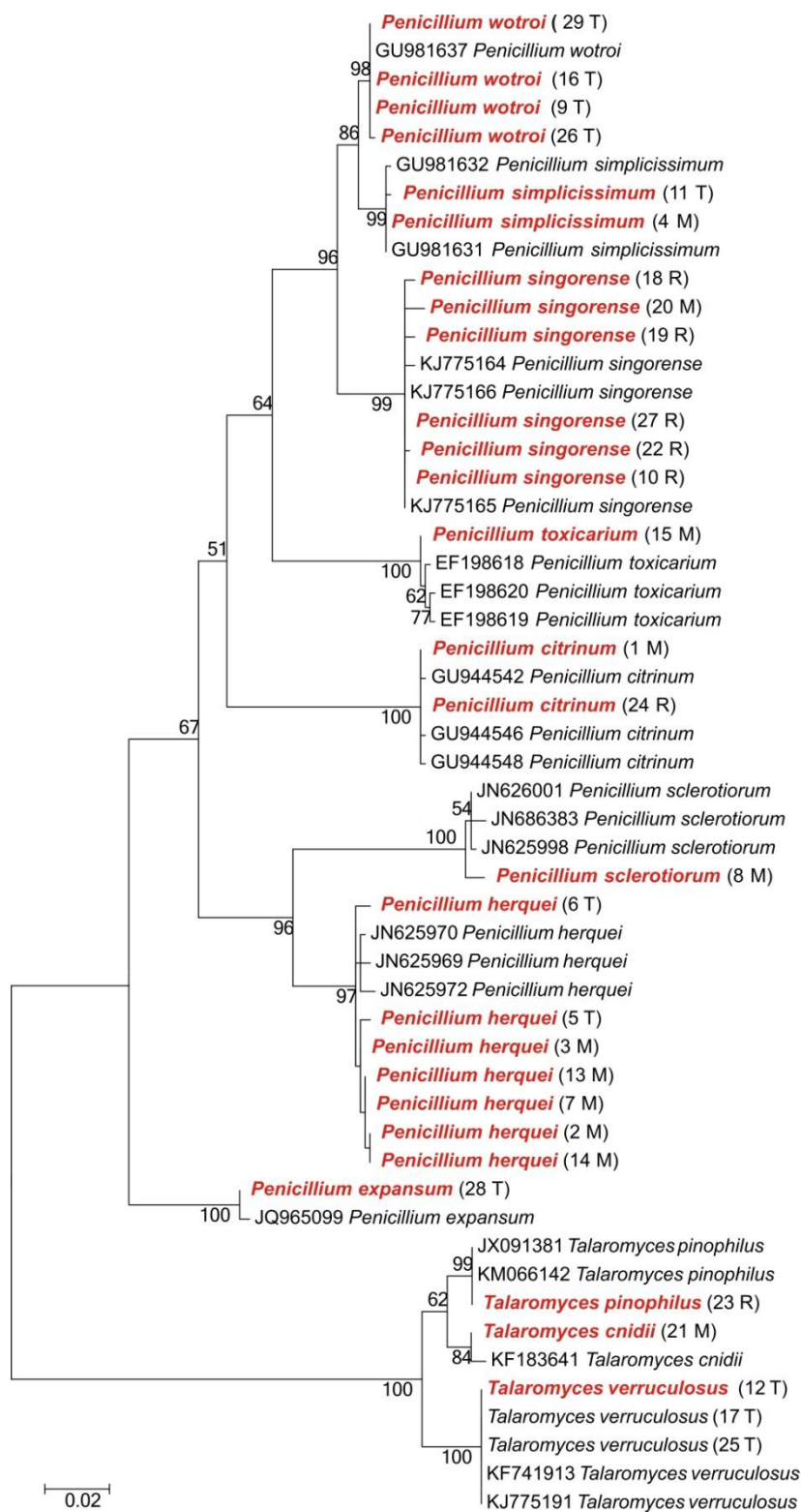


Figura 7. Reconstrução filogenética de Máxima verossimilhança dos fragmentos concatenados da região ITS1-5.8S-ITS2 e da beta tubulina dos isolados de *Penicillium* e *Talaromyces* isolados a partir de amostras de solo de manguezal, restinga e tabuleiro. Valores de suporte calculados com 1000 bootstrap. Modelo de substituição de Kimura 2-parametros. Sequencias obtidas nesse estudo estão em destaque.

O sequenciamento das regiões ITS e BenA dos isolados gerou sequências que foram utilizadas para realização de uma busca por sequências homólogas na base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando o programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997). Um total de 24 sequências foram recuperadas e foram utilizadas para fazer um alinhamento múltiplo, o qual foi editado e então utilizado para gerar a árvore filogenética.

Na árvore filogenética é possível distinguir seis grupos (Figura 7): Grupo I formado por espécies de *Penicillium wotroi*, *P. simplicissimum* e *P. singorense*; o Grupo II composto por espécies *P. toxicarium*; o grupo III formado por espécies de *P. citrinum*; o grupo IV formado por espécies *P. herquei* e *P. sclerotiorum*; o grupo V composto por espécies de *P. expansum* e grupo VI formado por espécies de *Talaromyces*, que foram utilizadas para enraizar a árvore.

Analises Ecológicas

Dentre as espécies isoladas, três ocorreram apenas no manguezal (*P. toxicarium*, *P. sclerotiorum*, *T. cnidii*); cinco ocorreram tanto em solo de manguezal quanto de tabuleiro (*P. wotroi*, *P. herquei*, *P. simplicissimum*, *P. expansum* e *T. verruculosus*); uma espécie (*P. citrinum*) ocorreu tanto em solo de manguezal quanto de restinga e duas espécies foram encontradas nos três diferentes ecossistemas (*P. singorense* e *T. pnophilus*) (Tabela 2).

Tabela 2. Número de isolados das espécies de *Penicillium* de solo de Mata Atlântica.

Espécie	Manguezal	Tabuleiro	Restinga	Total
<i>P. citrinum</i>	5	0	3	8
<i>P. expansum</i>	2	5	0	7
<i>P. herquei</i>	18	14	0	32
<i>P. sclerotiorum</i>	2	0	0	2
<i>P. simplicissimum</i>	9	3	0	12
<i>P. singorense</i>	1	1	29	31
<i>P. toxicarium</i>	2	0	0	2

<i>P. wotroi</i>	19	11	0	30
<i>T. cniddi</i>	4	0	0	4
<i>T. pnophilum</i>	9	19	4	32
<i>T. verruculosus</i>	3	8	0	11
Total	74	61	36	171

De acordo com o índice de diversidade de Shannon-Wiener (1948), o presente estudo revelou que solo de manguezal apresentou maior diversidade como também maior riqueza em relação aos de tabuleiro e restinga. Isso pode estar relacionado aos componentes do solo como Ca, Mg, Na, K e N que neste ambiente de manguezal estão em maior quantidade quando comparados aos outros dois ecossistemas (Tabela 3).

Cruz et al., (2013) pesquisando a diversidade de espécies da mata atlântica e caatinga, observou de acordo com o Índice de ShannonWiener, que em ambos os biomas a diversidade foi alta

No ecossistema de restinga encontramos o índice mais alto de dominância onde a espécie *P. singorense* foi a mais abundante. Uma característica importante é que no ecossistema de restinga o componente P está menos disponível no solo, e seu pH mais ácido (2,0). Podemos assim inferir que *P. singorense* ocupa em abundância essas áreas por se desenvolver bem em ambientes com baixa disponibilidade deste componente, bem como em solos mais ácidos.

Cruz et al., (2013) encontrou para mata atlântica as espécies dominantes durante o período chuvoso *Penicillium griseofulvum*, *P. aurantiogriseum*, *P. simplicissimum*, *P. janthinellum*, *P. fellutanum* e *P. glabrum*. e durante o período seco as espécies dominantes foram *Penicillium fellutanum*, *P. griseofulvum*, *P. glabrum*, *P. janthinellum* e *P. restrictum*.

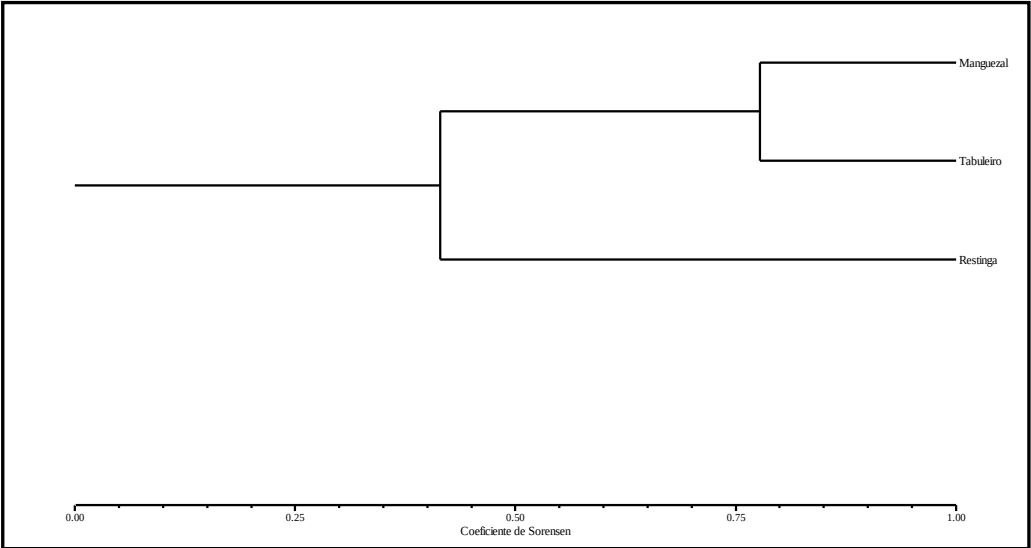
Os resultados encontrados por Santos (2013) ao estudar as restingas baianas através de análise de solo confirmaram a baixa fertilidade do solo, acidez, textura arenoza e pobreza de matéria orgânica. A falta de cátions de Ca, Mg, Na e K deixa o solo saturado de cargas negativas neutralizadas (Al e H) causando acidez nos solos. Em nosso estudo isso também foi observado, possuindo um pH mais ácido (2,0), o solo de restinga apresentou valores mais altos para Al (0,30) e H (4,56) quando comparado aos outros ecossistemas (Tabela 3).

O índice de Similaridade de Sorensen apresenta a maior similaridade existente entre os ecossistemas de manguezal e tabuleiro, que estão equidistantes do ecossistema de restinga (Figura 8).

Tabela 3.Número de Unidades formadoras de colônias (UFC), Riqueza de Espécies, Diversidade de Shannon-Wiener (H’), Equitabilidade de Pielo (e) e Dominância de Berger-Parker de fungos filamentosos isolados de solo manguezal (Man), tabuleiro (Tab) e restinga (Res) e análise química de cada solo.

ANALISES ECOLOGICAS						ANALISE DO SOLO								
Ecossistema	UFC	Riqueza	Diversidade	Equitabilidade	Dominância									
						Lab	P	pH	Ca	Mg	Cmolc/dm³Ca		Al	H
											Na	K		
Man	74	11	2,03	0,84	0,26		4	5.80	2.80	1.00	4.30	0.18	0.00	2.30
Tab	61	7	1,70	0,87	0,31	5-07A	4	6.10	0.60	0.65	0.06	0.05	0.00	2.39
Res	36	3	0,62	0,57	0,80	6-	7-	2	0.60	0.65	0.06	0.05	0.30	4.56

Figura 8. Dendrograma de similaridade representativos das comunidades de fungos filamentosos isolados do solo de manguezal, tabuleiro e restinga.



Enzimas Ligninolíticas

Para a seleção quanto à produção de enzimas ligninolíticas foram testados 25 isolados de *Penicillium* e *Talaromyces*, sendo selecionado pelo menos um isolado de cada espécie ocorrente em cada uma das áreas estudadas. Todos os isolados foram produtores das três enzimas, apresentando atividade máxima e mínima para Lignina peroxidase (LiP) de 477 U/L e 84 U/L respectivamente (Tabela 4); para Lacase (LaC) de 701 U/L e 21 U/L respectivamente e para Manganês peroxidase (MnP) máxima de 133 U/L e mínima de 9 U/L.

Tabela 4. Atividade enzimática das enzimas ligninolíticas Lignina peroxidase (LiP), Lacase (LaC) e Manganês peroxidase (MnP).

Isolado	LiP (U/L)	Lac (U/L)	MnP (U/L)
<i>P. citrinum 1</i>	169	52	62
<i>P. citrinum 2</i>	179	27	73
<i>P. expansum</i>	164	32	61
<i>P. herquei 1</i>	182	431	75
<i>P. herquei 2</i>	152	116	39
<i>P. herquei 3</i>	168	21	34
<i>P. herquei 4</i>	477	35	31
<i>P. herquei 5</i>	184	55	69
<i>P. sclerotiorum</i>	216	701	133
<i>P. simplicissimum 1</i>	208	43	62
<i>P. simplicissimum 2</i>	100	43	26
<i>P. singorense 1</i>	184	41	21
<i>P. singorense 2</i>	219	23	31
<i>P. singorense 3</i>	198	37	87
<i>P. singorense 4</i>	166	35	21
<i>P. singorense 5</i>	361	32	23
<i>P. toxicarium</i>	251	351	44
<i>P. wotroi 1</i>	168	58	21
<i>P. wotroi 2</i>	142	691	42
<i>P. wotroi 3</i>	159	105	61
<i>T. cnidii</i>	183	35	41

<i>T. pinophilus</i>	191	52	25
<i>T. verruculosus 1</i>	199	55	105
<i>T. verruculosus 2</i>	158	38	52
<i>T. verruculosus 3</i>	84	37	9

Quanto a produção de enzimas ligninolíticas Moreira-Neto (2006) avaliando a produção de peroxidases por *Psilocybe castanella* em solo contaminado com hexaclorobenzeno (HCB) e no solo-controle sem HCB, verificou que a presença do HCB influenciou a produção da atividade de peroxidases, obtendo maior atividade em 12 dias de 103,71 UL⁻¹ enquanto no solo-controle a maior atividade foi observada aos 19 dias de crescimento (100,00 UL⁻¹), resultados inferiores aos encontrados em nosso trabalho de 477 UL por *P. herquei*.

Silva et al. (2004), obtiveram através de Fermentação Submersa utilizando farelo de trigo como substrato, a maior atividade enzimática de 6.079 U/L para lignina peroxidase pela linhagem P11SA4F, isolada de solo sob cultivo de arroz irrigado, valor menor que a atividade mínima encontrada para LiP de 84 U/L enquanto no presente estudo, também através de FSm utilizando farelo de trigo como substrato obtivemos atividade máxima LiP de 477 UL por *P. herquei*. Para MnP, Silva et al. (2004), também encontraram atividade inferior ao presente estudo (133 UL⁻¹ por *P. sclerotiorum*), obtendo atividade máxima de 2,765 UL.

Baptista (2011) utilizando *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune* encontraram resultados superiores aos nossos atingindo 2.500 U/L e 1.947 U/L para LiP e Lacase respectivamente, obtendo a melhor produção obtida pelo fungo *P. commune*, constatando, assim como no presente estudo, que o gênero é um bom produtor de enzimas ligninolíticas.

O *P. sclerotiorum*, ainda não relatado como produtor de enzimas ligninolíticas, se destacou na produção das três enzimas, sendo o melhor produtor tanto para a Lacase quanto para Manganês Peroxidase e o quinto melhor na produção de Lignina Peroxidase.

6 CONCLUSÕES

- O gênero *Penicillium* apresenta uma taxonomia complexa e por isso necessita de ferramentas que complementem sua identificação;
- A biologia molecular é uma eficiente ferramenta disponível para confirmação taxonômica;
- As regiões ITS e β tubulina são excelentes ferramentas para a identificação molecular de linhagens de *Penicillium*. Entretanto, em alguns casos torna-se necessária a análise de outros genes, visando uma identificação mais robusta;
- A identificação morfológica é ainda o primeiro passo para o processo de identificação de linhagens de *Penicillium*, podendo ser conclusiva, em casos onde a identificação molecular não foi suficiente;
- O ecossistema de manguezal é mais rico e diverso que o ecossistema tabuleiro e restringe quanto à microbiota do solo;
- Linhagens de *Penicillium* são promissoras para a produção de enzimas ligninolíticas por FSm utilizando farelo de trigo como substrato;
- *P. sclerotiorum* está sendo indicado para ser utilizado em estudos posteriores de otimização da produção de enzimas do complexo ligninolítico.

REFERÊNCIAS

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley.
- Almeida, P.M.M.; Soares, M.L.G.; Kampel, M. Monitoramento de uma área de manguezal na região metropolitana do Rio de Janeiro através de técnicas de sensoriamento remoto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OCEANOGRAFIA, 3, 2008, Fortaleza; CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE OCEANOGRAFIA, 1, 2008, Fortaleza. Anais... Fortaleza: CNPq/Programa Instituto do Milênio - Estuários [s.n.], 20 a 24 mai. 2008.
- Araújo A. M.; Mineiro, A. L. B.; Cantalice, J. R. B. Estimativa do potencial de sedimentação e erosão: caso Manguezal do Pina, Recife (PE) EngSanitAmbient | v.16 n.2 | abr/jun 2011 | P. 133-140
- Asan, A. 2000. Check List of *Aspergillus* and *Penicillium* Species Reported From Turkey. Turkish Journal of Botany 24: 151-167.
- Asan, A. 2004. *Aspergillus*, *Penicillium*, and Related Species Reported from Turkey. Mycotaxon 89 (1): 155-157.
- Asan, A.; Okten, S.S.; Sen, B. 2010. Airborne and soilborn microfungi in the vicinity Hamitabat Thermic Power Plant in Kirklareli City (Turkey), their seasonal distributions and relations with climatological factors. *Environmental Monitoring and Assessment* 164: 221–231.
- Baldrian, P., Voříšková, J., Dobiášová, P., Merhautová, V., Lisá, L., Valášková, V. 2011. Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant and Soil* 338: 111–125.
- Barbosa, M.R.; Thomas, W. 2002. Biodiversidade, conservação e uso sustentável da Mata Atlântica no Nordeste. In: Araújo, E.L. et al. (eds.) *Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil*. Recife: UFRPE, Brasil/Imprensa Universitária, pp. 19 – 22.
- Barbosa, R. N.; Bezerra, J D. P.; Costa, P. M. O.; Lima-Júnior, N. C.; Galvão, I. R G. A S.; Santos-Júnior, A. A.; Fernandes, M. J. ; Souza-Motta, C. M. & Oliveira, N. T. 2015. *Aspergillus* and *Penicillium* (Eurotiales: Trichocomaceae) in soils of the Brazilian tropical dry forest: diversity in an area of environmental preservation.. *Revista de Biologia Tropical* Vol. 64 (1): 45-53.
- Belmares, R.; Contreras-Esquivela, J.C.; Rodriguez-Herrera, R.; Coronel, A.R.; Aguilar, C.N. 2004. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *Lebensmittelwissenschaft* 37: 857–864.
- Bonugli-Santos, R. C., Durrant, L. R., Silva, M., Sette, L. D. 2010. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 46: 32–37.
- Bon, E.P.S., Ferrara, M.A., Corvo, M.L. 2008. *Enzimas em Biotecnologia Produção, aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro, Editora Interciência.

- Câmara, I.G. 1996. *Plano de ação para a Mata Atlântica. Roteiro para a conservação e sua biodiversidade*. Séries Cadernos da Reserva da Biosfera.
- Carvalho, W., Canilha, L., Ferraz, A., Milagres, A. M. F. 2009. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Química Nova* 32: 2191-2195.
- Chen, J.L.; Yen, J.H.; Lin, W.S.; Ku, W.L. 2002. A new synnematus species of *Penicillium* from soil in Taiwan. *Mycologia* 94 (5): 866-872.
- Coutinho, L.M. 2006. O conceito de bioma. *Acta Botânica Brasileira* 20 (1): 13-23.
- Coutinho, F.P.; Cavalcanti, M.A.Q.; Yano-Melo, A.M. 2010. Filamentous fungi isolated from the rhizosphere of melon plants (*Cucumis melo* L. cv. Gold Mine) cultivated in soil with organic amendments. *Acta Botânica Brasileira* 24 (1): 292-298.
- Cruz, C.B.M.; Vicens, R.S.; Seabra, V.S.; Reis, B.R.; Faber, O.A.; Richter, M.; Arnaut, P.K.E.; Araújo, M. 2007. Classificação orientada a objetos no mapeamento dos remanescentes da cobertura vegetal do bioma Mata Atlântica, na escala 1:250.000. In: *Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Florianópolis, Brasil, pp. 5691-5698.
- Cruz, R.; Lima, J. L.; Fonseca, J. C.; Fernandes, M. J. S.; Lima, D. M. M.; Duda, G. P.; Moreira, K.A.; Souza-Motta, C. M. 2013. Diversity of Filamentous Fungi of Area from Brazilian Caatinga and High-Level Tannase Production Using Mango (*Mangifera indica* L.) and Surinam Cherry (*Eugenia uniflora* L.) Leaves under SSF. *Advances in Microbiology*, 2013, 3, 52-60
- Cruz, R. ; SANTOS, C. ; Lima, J.S. ; MOREIRA, K. A. ; Souza-Motta, C. M. . Diversity of *Penicillium* in soil of Caatinga and Atlantic Forest areas of Pernambuco, Brazil: an ecological approach. *Nova Hedwigia* , v. 97, p. 543-556, 2013.
- Da Silva, D.C.V.; Tiago, P.V.; de Mattos, J.L.S.; Paiva, L.M.; Souza-Motta, C.M. Isolation and screening of filamentous fungi from soil of agroforestry systems in the Municipality of Bom Jardim (PE) for the ability to produce hydrolytic enzymes *Revista Brasileira de Botânica* Volume 34 2011 Pag 607-610.
- De Souza, C. G., Peralta, R. M. 2003. Purification and characterization of the main laccase produced by White-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal Basic Microbiology* 43: 2277-2282.
- De Souza, C. R. L., Peralta-Zamora, P. 2006. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio. *Química Nova* 28: 226-228.
- Demirel, R.; Sariozlu, N. Y. and İlhan, S. Polymerase Chain Reaction (PCR) Identification of Terverticillate *Penicillium* Species Isolated from Agricultural Soils in Eskişehir Province. Vol.56, n.6: pp. 980-984, 2013 Frisvad, J.C.; Smedsgaard, J.; Larsen, T.O.; Samson, R.A. 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus. *Studies in Mycology* 49: 201-242.
- Davolos, D.; Pietrangeli, B.; Persiani, A. M. and Maggi, O. *Penicillium simile* sp. nov. revealed by morphological and phylogenetic analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2012), 62, 451–458.

- Refai, M.; El-Yazid, H. A. and Tawakkol, W. Monograph on the genus *Penicillium*. Cairo University. Disponível em < <http://www.researchgate.net/publication/273695076> >
- Falkenberg, D.B. 1999. Aspectos da flora e da vegetação secundária da restinga de Santa Catarina, sul do Brasil. *Insula* 28: 1-30.
- Fernandes, L. A.; Lopes, P. S. N.; D'Angelo, S.; Dayrell, C. A.; Sampaio, R. A. Relação entre o conhecimento local, atributos químicos e físicos do solo e uso das terras. *R. Bras. Ci. Solo*, 32:1355-1365, 2008
- Gianfreda, L., Bollag, J. M. 2002. Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants. In: Burns, R. G., Dick, R. P. (eds.) *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. New York, Marcel Dekker.
- Giulietti, A.M. & Forero, E. 1990. "Workshop" diversidade taxonômica e padrões de distribuição das angiospermas brasileiras. Introdução. *Acta Botanica Brasilica* 4:3-9.
- Gomes, D. N. F. 2008. *Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco*. 94f. Tese (Programa de Pósgraduação em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.
- Gomez, E.R.; Pioli, R.; Conti, M. 2007. Fungal abundance and distribution as influenced by clearing and land use in a vertic soil of Argentina. *Biology ; Fertility Soils* 43: 373-377.
- Grishkan, I.; Tsatskin, A.; Nevo, E. 2008. Diversity of cultured microfungal communities in surface horizons of soils on different lithologies in Upper Galilee, Israel. *European Journal of Soil Biology* 44 (2): 180-190.
- Guimarães, L. H. S., Peixoto-Nogueira, S. C., Michelin, M., Rizzatti, A. C. S., Sandrim, V. C., Zanoelo, Aquino, F. F., A. C. M. M., Junior, A. B., Polizeli, M. L. T.M. 2006. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 474-480.
- Higuchi, T. Mechanisms of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white-rot fungi. In: LEWIS, N. G.; PAICE, M. G. (Ed.). *Biogenesis and biodegradation of plant cell polymers*. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 482-502. (ACS Symposium Series, 399). IN: *Produção de Enzimas Ligninolíticas por Fungos Isolados de Solos sob Cultivo de Arroz Irrigado* – Silva et al., 2004. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*.
- Houbraken, A.M.P.; Frisvad, J.C. Samson, R.A. 2010. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity* 44: 117–133.
- Hujšlová, M.; Kubátová, A.; Chudíčková, M.; Kolařík, M. 2010. Diversity of fungal communities in saline and acidic soils in the Soos National Natural Reserve, Czech Republic. *Mycol Progress* 9: 1–15.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 29 de maio 2011.
- Kirsop, B.E.; Doyle, A. 1991. *Maintenance of Microorganisms and Cell Cultures-A Manual of Laboratory Methods*. London, 2nd ed., Academic Press.

- Kunz, A., Peralta-Zamora, P., Moraes, S. G., Durán, N. 2002. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*, 25: 78-82.
- Kurek, E.; Kornilłowicz-Kowalska, T.; Slomka, A.; Melke, J. 2007. Characteristics of soil filamentous fungi communities isolated from various micro-relief forms in the high Arctic tundra (Bellsund region, Spitsbergen). *Polish Polar Research* 28 (1): 57-73.
- Lamberti, A. 1969. Contribuição ao Conhecimento da Ecologia das plantas do Manguezal de Itanhaém. Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Botânica 23: 1-217.
- Macedo, T. S.; Fernandes, L. L.; Silva, D. F.; Varjão, A. S.; Neves, A. S. e Pigozzo, C. M. Comparação florística entre um fragmento de Mata Atlântica e ambientes associados (restinga e manguezal) na cidade de Salvador, Bahia. *Candombá – Revista Virtual*, v. 3, n. 2, p. 138–148, 2007
- Maciel, C. C. S. 2010. Produção de enzimas do sistema lignolítico e biossurfactante por *Curvularia luneta* (UFPEA 885), usado óleo diesel como substrato. 142f. Tese (Pós-Graduação em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.
- Maciel, C. C. S., Souza, M. A., Gusmão, N. B. Campos-Takaki, G. M. 2010. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. *Exacta* 8: 299-305.
- Markovina, A.L.; Pitt, J.I. Hocking, A.D; Carter, D.A.; McGee, P.A. 2005. Diversity of the Trichocomaceae in the Katandra Nature Reserve, Central Coast, NSW, Australia. *Mycological Research* 109 (9): 964–973.
- Markovina, A.L.; Pitt, J.I. Hocking, A.D; Carter, D.A.; McGee, P.A. 2005. Diversity of the Trichocomaceae in the Katandra Nature Reserve, Central Coast, NSW, Australia. *Mycological Research* 109 (9): 964–973.
- Moreno, M.R., NASCIMENTO, M.T. & KURTZ, B. 1998. Estrutura e composição florística do estrato arbóreo em duas zonas altitudinais diferentes em Mata Atlântica de encosta na região do Imbé, RJ: primeira aproximação. In Anais do IV Simpósio de Ecossistemas Brasileiros. (S. Watanabe, coord.), ACIESP, v.II, p.64-70.
- MOREIRA-NETO, S. L. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno SÃO PAULO Dissertação Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, Biodiversidade vegetal e Meio ambiente. 2006
- Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.; Kent, K. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-845.
- Oliveira, E.S. Brazilian mangal vegetation with special emphasis on the seaweeds. In: POR, F.D.; DOR, I. (Eds.). *Hydrobiology of the Mangal. The Ecosystem of the Mangrove Forests*. Boston: Dr. W. Junk Publishers, 1984, p. 55-65.
- Onions, A.H.S.; Brady, B.L. 1987. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In: Peberdy, J.F. (Ed.) *Biotechnology Handbooks 1 Penicillium and Acremonium*. New York and London, Plenum Press, pp. 1-36.

- Pinto, G.A.S.; Brito, E.S. Andrade, A.M.R.; Fraga, S.L.P.; Teixeira, R.B. 2005. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. EMBRAPA Comunicadotécnico online 1:5.
- Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T. 2002. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor*. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 37663–37669. S at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers
- Pitt, J.I. 1979. *The Genus Penicillium and its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces*. London, Academic Press.
- Pitt, J.I. 1991. *Alaboratory Guide to Common Penicillium Species*. North Wales: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing.
- Pitt, J.I.; Samson, R.A.; Frisvad, J.C. 2000. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: Samson, R.A.; Pitt, J.I. (eds). *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Amsterdam, Harwood Academic Publishers, pp. 9-47.
- Pointing, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p. 20-33, 2001.
- Praveen, K., Viswanath, B., Usha, K. Y., Pallavi, H., Reddy, G. V. S., Naveen, M., Reddy, B. R. 2011. Lignolytic Enzymes of a Mushroom *Stereum ostrea* Isolated from Wood Logs. *Enzyme Research* 2011: 1-6.
- Ramirez, C. 1982. *Manual and Atlas of the Penicillia*. Amsterdam, Elsevier Biomedical.
- Raper, K.B.; Thom, C. 1949. *A manual of the Penicillia*. Baltimore, Williams and Wilkins.
- Resende, M.; Lani, J.L.; Rezende, S.B. 2002. Pedossistemas da Mata Atlântica: considerações pertinentes sobre sustentabilidade. *Revista Árvore* 26 (3): 261-269.
- Rizzini, C. T. 1979. *Tratado de fitogeografia do Brasil*. v.2. Aspectos ecológicos. Hucitec / Edusp, São Paulo
- Samson R.A. 2000. *Integration of Modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers. Singapore.
- Samson, R.A.; Frisvad, J.C. 2004. *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: new Taxonomics Schemes, Mycotoxins and Other Extrolites. *Studies in Mycology* 49: 1-260.
- Samson, R.A.; Seifert, K.A.; Kujipers, A.F.A.; Houbraken, J.A.M.P.; Frisvad, J.C. 2004. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Studies in Mycology* 49: 175-200.
- Samson, R.A.; Varga, J. Witiak, S.M.; Geiser, D.M. 2007. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. *Studies in Mycology* 59: 71-73.
- Samson, R.A.; Yilmaz, N.; Houbraken, J.; Spierenburg, H.; Seifert, K. A.; Peterson, S.W.; Varga, J. and Frisvad, J.C. Phylogeny and nomenclature of the genus

- Talaromyces and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology* 70: 159–183. 2011.
- Sampaio, D.; Souza, V.C.; Oliveira, A.A.; Souza-Paula, J. & Rodrigues, R.R. 2005. Árvores de restinga: guia ilustrado para identificação das espécies da Ilha do Cardoso. São Paulo, Neotrópica.
- Santos, J.J. (coord). Relatório técnico da campanha de primavera (outubro/ novembro) no manguezal de Mucuri -Bahia. CEPEMAR/BAHIA SUL CELULOSE: Instituto de Biologia/UFBA, 1993.
- Santos, C.; Paterson, R.R.M.; Venâncio, A.; Lima, N. 2009. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* 108: 375-385.
- Schaeffer-Novelli, Y. 1995. Manguezal - Ecossistema entre a terra e o mar. São Paulo, Caribbean Ecological Research.
- Schaeffer-Novelli, Y. et al Brazilian mangroves. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, v. 3, p. 561-570, 2000.
- Santos, V. J. Restingas do estado da Bahia: riqueza, diversidade e estrutura. 2013, 145 p. Tese Programa de pós-graduação em botânica- UFRPE. Recife, PE
- Sherf, A.F. (1943). A method for maintaining *Phytophthora* in culture for long periods without transfer. *Phytopathology*. 33, 330-332.
- Shraddha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., Kumar, A. 2011. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Research* 2011: 1-11.
- Song, M., Pedruzzi, I., Peng, Y., Li, P. , Liu, J., Yu, J. Extraction from *Muscovita* by the Isolated Fungi . *Geomicrobiology Journal* 2015, 9p
- SOS Mata Atlântica. 2011. Disponível em: <http://www.sosmataatlantica.org.br/observatorio/plmataatlantica.html>. Acesso em: 29 de maio de 2014.
- SOS Mata Atlantica. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica>>. Acesso em: 07 de outubro de 2015.
- Souza, H. Q., Oliveira, L. A., Andrade, J. S. 2008. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28: 116-124.
- Souza-Motta, C.M.; Cavalcanti, M.A.Q.; Fernandes, M.J.S.; Lima, D.M.M.; Nascimento, J.P.; Laranjeira, D. 2003. Identification and Characterization of filamentous fungi isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolyse inulin. *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 273-280.
- Stotz, H.U.; Long, S.R. 1999. Expression of the pea (*Pisum sativum* L) alpha-tubulin gene is correlated with cell division activity. *Plant Molecular Biology* 41: 1-14.
- Tabarelli, M.; Pinto, L.P.; Silva, J.M.C.; Hirota, M.M.; Bedê, L.C. 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade* 1 (1): 132-138..

- Tabarelli, M. et al. Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: lessons from aging human-modified landscapes. *Biological Conservation*, 2010.
- Trindade, M.B.; Figueira, S.B.; Silva, H.P.; Silva, A.C.B.L.; Schessl, M. 2005. Uso de sensoriamento remoto na análise da fragmentação de Mata Atlântica no litoral norte de Pernambuco, Brasil. In: *XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Goiânia, Brasil, pp. 705-712.
- Tuszynski, J.A.; Carpenter, E.J.; Huzil, J.T.; Malinski, W.; Luchko, T.; Ludueña, R.F. 2006. The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. *Developmental Biology*, 50: 341-358.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.
- V&S Ambiental / NEMUS. Estudos ambientais para a implantação de sistema de travessia Salvador / Ilha de Itaparica sobre a Baía de Todos os Santos. Estudo de Impacto Ambiental. v. 2 – Diagnóstico Ambiental Tomo 2 - Diagnóstico do Meio Biótico 2015 disponível em http://www.inema.ba.gov.br/wp-content/uploads/2015/09/01.-EIA_Volume-2_Tomo_2-Diagn%C3%B3stico-do-Meio-Bi%C3%B3tico.pdf Acesso em 28 de janeiro de 2016.
- Yilmaz, N.; Visagie, C.M.; Houbraken, J.; Frisvad, J.C.; Samson, R.A. 2014. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology*. Vol. 78, Pag 175–341