



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

MAYARA LUIZA DE SOUSA PEREIRA

**DIVERSIDADE DA MICROBIOTA DA CAVERNA FURNA DOS
MORCEGOS EM ÁREA DE CAATINGA, PERNAMBUCO**

RECIFE

07/2021

MAYARA LUIZA DE SOUSA PEREIRA

**DIVERSIDADE DA MICROBIOTA DA CAVERNA FURNA DOS
MORCEGOS EM ÁREA DE CAATINGA, PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia de Fungos da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Biologia de
Fungos. Área de concentração:
taxonomia de fungos

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a Cristina Maria de Souza-Motta

Coorientador: Prof. Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra

RECIFE

07/2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Pereira, Mayara Luiza de Sousa

Diversidade da micobiota da caverna fumaça dos morcegos em área de Caatinga,
Pernambuco / Mayara Luiza de Sousa Pereira. - 2021.

93 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Maria de Souza-Motta.

Coorientador: Prof. Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos,
Recife, 2021.

Inclui referências e apêndices.

1. Fungos. 2. Caatinga. 3. Cavernas. I. Souza-Motta, Cristina Maria de
(orientadora). II. Bezerra, Jadson Diogo Pereira (coorientador). III.
Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-021

MAYARA LUIZA DE SOUSA PEREIRA

**DIVERSIDADE DA MICROBIOTA DA CAVERNA
FURNA DOS MORCEGOS EM ÁREA DE CAATINGA, PERNAMBUCO**

Dissertação ou Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 30/07/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Diogo Xavier Lima (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Eder Silva Barbier (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Quero dedicar essa dissertação ao meu avô Alvino Pereira da Silva, que faleceu em março de 2019. Meu avô que fazia questão de ir no mercado comigo comprar Yakult toda vez que eu ia fazer uma visita, e íamos juntos caminhando e conversando sobre a vida. Ele ficava feliz quando sabia que eu estava indo bem no colégio, e sempre me aconselhava a estudar, a fazer um curso superior, porque o estudo era o caminho de uma vida digna, e como é importante buscar estabilidade financeira. Que me acompanhou na cerimônia de formatura do colegial, mesmo precisando do auxílio de uma bengala para se locomover, que mesmo aos 98 anos, com a memória debilitada, perguntava se eu tinha me formado, se estava me arrumando na vida. Espero que o senhor esteja orgulhoso de sua neta, que lê ama, e vai lê ter sempre na memória.

AGRADECIMENTOS

Agradecer em primeiro lugar ao Departamento de Micologia, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, e a Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por ter me concedido a bolsa de mestrado.

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Cristina Maria de Souza Motta e ao Prof. Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra pelas orientações ao longo desses dois anos. Agradecer ao Prof. Dr. Enrico Bernard e ao Dr. Eder Barbier pela ajuda na realização da coleta das amostras.

A Joenny Maria por ter sido minha guia e coorientadora não oficial, e ter me ensinado e ajudado em tantas coisas. Aos meus amigos de turma Camila Vogley, Danilo Chagas e Jaíne Maria pela companhia nessa aventura. Aos meus pais, que são meu alicerce e a minha melhor amiga Juliana Alves que escutou minhas reclamações e paranoias e para finalizar agradeço a todos que me apoiaram e me mandaram energias positivas.

RESUMO GERAL

Os fungos são componentes importantes das cavernas já que participam da decomposição de matéria orgânica, desenvolvendo assim um papel ecológico importante na estruturação da comunidade cavernícola. São considerados como ambientes extremos possuindo condições abióticas severas e abrigam uma rica diversidade de microrganismos. A bat cave estudada foi a Furna do Morcego, localizada no Parque Nacional do Catimbau, no município de Ibimirim-PE, na Caatinga nordestina, a espécie de morcego em que foi realizada a coleta foi *Pteronotus gymnonotus*, morcego insetívoro. Foram coletadas amostras do ar da caverna, do guano dos morcegos nas duas câmaras da caverna, e do corpo (asa, do pelo e da cavidade oral) de 6 espécimes de morcegos. As amostras do ar foram obtidas por exposição das placas e as do guano e do corpo foram manipuladas em condições assépticas para o isolamento dos fungos, para identificação, foram realizadas análises morfológicas e filogenéticas utilizando sequências de ITS do rDNA. Representantes dos Ascomycota e dos Basidiomycota foram encontrados e filo Ascomycota foi dominante no ambiente cavernícola. Os gêneros mais frequentes foram, *Cladosporium*, incluindo duas novas espécies, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Diaporthe* e *Fusarium*. Outros gêneros normalmente não reportados em cavernas também foram encontrados, como, *Phoma*, *Cystospora*, *Malbranchea*, entre outros. Poucos gêneros pertenceram ao filo Basidiomycota, como *Sakaguchia*, e *Rhodotorula*. Alguns gêneros de importância médica foram isolados, como *Candida* e *Meyerozyma*, que são conhecidos por causar micoses superficiais e sistêmicas. Também foram isoladas espécies usadas no controle biológico, *Beauveria bassiana* e na bioprospecção, *Wickerhamomyces anomalus*. O que demonstra a importância de pesquisas em cavernas. Existe uma diversidade de microrganismos nesses ambientes, que podem representar riscos à saúde humana, que podem ser utilizados na biotecnologia e contribuir com a descoberta de espécies novas para a ciência.

Palavras-chave: Fungos; Cavernas; Ascomycota.

ABSTRACT

Fungi are important components of caves as they participate in the food strategies of cave fauna and decompose organic matter and also play an important ecological role in structuring the cave community. Caves represent a unique ecosystem in which chemical and physical conditions are stable. They are considered extreme environments with severe abiotic, oligotrophic conditions, low temperatures, low light, high humidity and harbor a rich diversity of microorganisms. The cave of choice was Furna dos Morcegos, located in the Catimbau National Park, in the municipality of Ibimirim, in the northeastern Caatinga, it's a bat cave, bat caves are caves that have a large amount of bats, the species of bat present in this study was *Pteronotus gymnonotus*, an insectivorous bat. Air samples were collected from the air, which was divided into two chambers, the bat's guano sample was collected in both chambers, and wing, fur and oral cavity samples were collected from 6 specimens. Morphological and phylogenetic analyzes were performed, identifying several genera. The Ascomycota phylum dominates the cave environment and Furna dos Morcegos was no different, the most identified genera were *Cladosporium*, including two new species, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Diaporthe* and *Fusarium*, which are genera generally found in research in underground environments were identified. But genera not normally reported in caves, such as *Phitomyces*, *Cystospora*, *Malbranchea*, among others, were also identified. And few genera of the phylum Basidiomycota, such as *Sakaguchia*, *Rhodotorula* were isolated. And no genus of the phylum Mucoromycota has been isolated. Some genera of medical importance have been isolated, such as *Candida* and *Meyerozyma*, which are known to cause superficial and systemic mycoses. Species used in biological control, *Beauveria bassiana* and in bioprospecting, *Wickerhamomyces anomalus*, were also isolated. Which shows the importance of studies and research in cave environments. There is a diversity of microorganisms in these environments, which can represent risks to human health and they can also be used in biotechnology research.

Key-words: Fungi; cave; Ascomycota.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1–	<i>Pteronotus gymnonotus</i>	15
Figura 2–	Caverna Furna dos Morcegos.....	21
Figura 3–	Hastes de sustentação confeccionadas para a coleta dos fungos anemófilos na caverna Furna do Morcego.....	22
Figura 4–	<i>Cladosporium</i> sp. nova 1, a. Conidioforo, b. Cadeia de conídios, c. Ramoconídio, d. Ramoconídio e conídio.....	33
Figura 5–	Colônias de <i>Cladosporium</i> sp. nova 1 em a. Batata Dextrose Ágar (BDA), b. Ágar Extrato de Malte (MEA), c. Aveia-Ágar (OA), d. Ágar Pobre em Nutrientes (SNA) por 14 dias em 28°C...	34
Figura 6–	<i>Cladosporium</i> sp. nova 2, a. Conidióforo com conídios, b. Conidióforo, c. Ramoconidio com conídios, d. cadeia de conídios.....	35
Figura 7–	Colônias de <i>Cladosporium</i> sp. nova 2 em a. Batata Dextrose Ágar (BDA), b. Ágar Extrato de Malte (MEA), c. Aveia-Ágar (OA), d. Ágar Pobre em Nutrientes (SNA) por 14 dias em 28°C...	36
Figura 8–	Árvore filogenética com base em máxima verossimilhança utilizando sequencias de ITS do rDNA. Isolados obtidos no presente estudo estão identificados com diferentes cores: azul são isolados do ar, verde isolados do guano, vermelho isolados da asa, laranja isolados do pelo e roxo isolados da cavidade oral dos morcegos. <i>Cunninghamella gigacellularis</i> URM 7400 e <i>Absidia caatinguensis</i> URM 7156 foram utilizadas como grupo externo.....	42
Gráfico 1–	Abundância/Riqueza dos fungos isolados do ar das câmaras da Caverna Furna dos Morcegos.....	31
Gráfico 2–	Abundância/Riqueza dos fungos isolados do corpo.....	38
Gráfico 3–	Abundância/Riqueza dos fungos isolados do guano.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Distribuição dos gêneros de fungos isolados do ar nas câmaras... da Caverna Furna do Morcegos	30
Tabela 2–	Gêneros dos fungos identificados do corpo dos morcegos.....	37
Tabela 3–	Gêneros dos fungos identificados do guano insetívoro.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC - Ágar Sabourad Dextrose

BDA - Batata Dextrose Ágar

BHI – Infusão Cérebro-coração

BI – Interferência Bayesiana

UFC- Unidade Formadora de Colônias

LABCEN/CB – Laboratório Central do Centro de Biociências

MEA- Ágar Extrato de Malte

MV– Máxima Verossimilhança

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica

OA – Aveia-Ágar

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

SAB- Sabouraud Dextrose Ágar

SNA – Ágar Pobre em Nutrientes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.2	OBJETIVOS.....	13
1.2.1	Objetivo geral.....	13
1.2.2	Objetivos específicos.....	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1	BAT CAVES.....	15
2.2	<i>PTERONOTUS GYMNONOTUS</i>	15
2.3	FUNGOS CAVERNÍCOLAS.....	16
3	MATERIAS E MÉTODOS.....	21
3.1	ÁREA DE COLETA.....	21
3.2	ISOLAMENTO DOS FUNGOS ANEMÓFILOS.....	21
3.3	ISOLAMENTO DOS FUNGOS DO GUANO INSETÍVORO.....	23
3.4	ISOLAMENTO DOS FUNGOS DO CORPO DOS MORCEGOS.....	23
3.5	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	24
3.6	OBTENÇÃO DO MICÉLIO PARA EXTRAÇÃO DO rDNA.....	24
3.7	PCR E SEQUENCIAMENTO.....	25
3.8	ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS (UFC).....	27
4.2	FUNGOS ANEMÓFILOS.....	27
4.2.1	Duas novas espécies de <i>Cladosporium</i>.....	31
4.3	FUNGOS ISOLADOS DO CORPO DOS MORCEGOS.....	36
4.4	FUNGOS ISOLADOS DO GUANO INSETÍVORO.....	39
4.5	IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS.....	41
5	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	APÊNDICE A- RICHNESS OF CLADOSPORIUM IN A TROPICAL BAT	53
	CAVE WITH A DESCRIPTION OF TWO NEW SPECIES.....	

1 INTRODUÇÃO

Fungos são cruciais aos ecossistemas cavernícolas, pelo seu papel como decompositores e parasitas, tendem a crescer em matéria orgânica, como por exemplo, fezes e cadáveres. A maioria dos fungos são encontrados na forma de esporos nos ambientes subterrâneos, que entraram nesses ambientes carregados pelo ar, pela água, por animais ou por visita  o humana (Pusz, et al., 2014).

Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* e *Alternaria* são os gêneros mais frequentemente relatados ocorrendo em cavernas. De acordo com Vanderwolf et al. (2013), os esporos de *Cladosporium* são os mais comuns no ar das cavernas. Docampo et al. (2011), mostrou que além de *Cladosporium*, grandes concentra  es de *Penicillium* também estão presente no ar cavernícola.

Fungos patog  nicos são fontes potenciais de alergias e infec  es para os espeleologistas. Uma investiga  o na Itália encontrou leveduras patog  nicas, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus laurentii*. E estudos em cavernas japonesas identificou 9 espécies de *Trichosporon*, incluindo sete gêneros novos, em 75% das amostras do guano dos morcegos. Inala  o repetida de esporos de *Trichosporon* pode causar pneumonia, com conseqüente desenvolvimento de tosse, e febre, esses sintomas são similares aos sintomas que alguns espeleologistas apresentam após visita  o as cavernas (Sugita, et al., 2005).

Os morcegos, por utilizarem as cavernas como abrigo, grutas e ocos de árvores que são ambientes favoráveis    propaga  o dos fungos, apresentam grande intera  o com fungos de potencial patog  nico. Destacam-se os dermatófitos, outros fungos filamentosos, e as leveduras oportunistas que já foram isoladas em amostras de fezes e das fossas nasais de morcegos. Para os morcegos, as intera  es com fungos podem ser desvantajosas. Em 2006, no nordeste dos Estados Unidos, uma nova doença foi descoberta afetando popula  es de morcegos, a qual foi denominada como síndrome do nariz branco.

Essa doença é causada pelo fungo *Pseudogymnoascus destructans* (Furtado, 2018).

Países neotropicais, como o Brasil, possuem ambientes subterrâneos com alta e baixa riqueza de espécies e abundância. A Caatinga é um bom exemplo, apresentando um grande número de cavernas, que são pobremente conhecidas e estudadas (Otálora-Ardila et al., 2020).

Bat caves são cavernas que abrigam milhares de populações de morcegos, como a Furna dos Morcegos localizada na Caatinga. A diversidade de fungos encontrados na Caatinga é melhor conhecida em associação com o solo, plantas e como decompositores, mas a micodiversidade associada aos morcegos, ainda é pouco explorada, sendo estudada por Cunha et al. (2020).

Esse estudo propõe conhecer a micobiota de uma *bat cave* da Caatinga, sendo este um dos primeiros realizados neste bioma.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

- Caracterização morfológica e filogenética dos fungos anemófilos, do guano e de três micro habitats do corpo dos morcegos, a cavidade oral, o pelo e as asas.

1.2.2 Específicos

- Quantificar as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de fungos do ar, do guano e de partes do corpo dos morcegos;
- Identificar os fungos isolados pela análise morfológica das características macro e microscópicas das colônias e através de técnicas de biologia molecular;
- Realizar de análises filogenéticas das amostras e identificação da posição taxonômica das espécies;

- Comparar as espécies de fungos encontradas com relação à procedência da amostra (ar, guano e corpo dos morcegos).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 BAT CAVES

Bat caves são cavernas que abrigam milhares de populações de morcegos no seu interior (Holsinger; Culver, 1988). Essas cavernas podem apresentar altas temperaturas geradas pela alta temperatura corporal das espécies de morcegos habitantes. Muitas dessas espécies possuem limites geográficos e algumas somente ocorrem nesse ambiente. Essa alta concentração de morcegos gera um microclima estável e uma abundante quantidade de guano, que funciona como abrigo e alimento para diversos invertebrados (Ladle et al., 2012) e fungos (Cunha et al., 2020).

2.2 PTERONOTUS GYMNONOTUS

Morcegos permanecem mais da metade de suas vidas nas cavernas. As cavernas provêm um ambiente estável e permanente para moradia dos morcegos, fornecendo proteção contra predadores, contra condições ambientais adversas, propício a reprodução, para cuidar da prole e para hibernação (Mena, 2016).

Pteronotus gymnonotus, Morcego- de- costas-nuas (fig. 1), pertence ao reino Animalia, filo Chordata, classe Mammalia, Ordem Chiroptera, família Mormoopidae (Molinari et al., 2008).

Figura 1. *Pteronotus gymnonotus*



Fonte: Feijó & Rocha (2017)

Caracterizam-se por possuir lábios expandidos com diversas dobras que dão uma aparência de “funil” a cavidade oral quando a boca está aberta. As narinas estão incorporadas ao lábio superior, formando uma placa lábio-nasal, sendo que o formato dessa placa é informativo na distinção das espécies da família. A pelagem é curta, fina e densamente distribuída ao longo do corpo. Sua coloração é bem variada (Pavan, 2014).

Essa espécie ocorre do sul do México ao sul do Peru, centro e nordeste do Brasil, na Bolívia, e Guiana. Também ocorre na Venezuela e na Colômbia (Molinari et al., 2008). Como outros mormoopidae, geralmente formam grandes colônias habitando preferencialmente cavernas quentes e úmidas (Pavan; Tavares, 2020).

É uma espécie insetívora se alimentando de muitos coleópteros. Vive em cavernas largas, muitas vezes junto com outros morcegos da mesma família (Molinari et al., 2008).

2.3 FUNGOS CAVERNÍCOLAS

Fungos são componentes importantes das cavernas já que participam na decomposição da matéria orgânica das cavernas (Rawat et al., 2017).

A longa viabilidade dos esporos fúngicos os ajuda a sobreviver nas condições ambientais das cavernas. Esses fungos geralmente atuam como parasitas ou decompositores. Podem também ajudar na formação de espeleotemas, como precipitação mineral secundária devido a baixas temperaturas e falta de substrato orgânico (Rawat et al., 2017).

Táxons fúngicos (espécies e gêneros combinados) das cavernas, 69.1% são Ascomycota, 20% Basidiomycota, 6.6% Zygomycota, 2.6 Mycetozoa, 1% Oomycota, e 0.8% outros (Amoebozoa, Chytridiomycota, Microsporidiomycota, percolozoa) (Vanderworlf et al. 2013). Ascomycota domina o ambiente cavernícola (Vanderworlf et al. 2013). *Aspergillus* e *Penicillium* são os fungos filamentosos mais comumente isolados de ambientes subterrâneos (Taylor et al., 2013).

O primeiro relato brasileiro de espécies fúngicas em cavernas (na floresta Amazônica) foi publicado por Castrillo'n et al. (1976), os quais isolaram fungos do solo, sendo, oito gêneros ascomicetos, incluindo um gênero dermatófito raro, *Microsporum amazonicum* (atualmente *Arthroderma amazonicum*) e diversos outros isolados sem identificação taxonômica.

Como consequência de uma possível infecção de oito biólogos por *Histoplasma capsulatum* após uma expedição a uma caverna, Rocha-Silva et al. (2014) demonstraram a importância de verificar a presença de espécies antes de autorizar a visita de pessoas as cavernas.

Existem poucos estudos sobre a riqueza de espécies fúngicas de *bat* caves brasileiras (incluindo fungos do ar, encontrados em morcegos e no guano) particularmente nas florestas tropicais secas (Caatinga) brasileiras. Cunha et al. (2020) estudaram a micobiota da caverna Meu Rei localizada na Caatinga brasileira, os fungos mais encontrados no ar pertenceram aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*. Outros táxons também foram reportados associados com plantas ou como fungos entomopatogênicos. Espécies de leveduras foram comumente isoladas dos morcegos, e novas espécies foram descritas, como por exemplo, espécie tolerante ao frio do gênero *Malassezia*. Uma nova espécie do gênero *Geosmithia* foi isolada da membrana da asa do morcego frugívoro *C. perspicillata* foi descrita. *Aspergillus* e *Penicillium* foram os gêneros mais encontrados nos isolados do guano dos morcegos.

Vanderworlf et al. (2013) mostrou que a falta de grande quantidade de substratos ricos em nutrientes nas cavernas pode explicar a diferença na quantidade de Basidiomycota em relação a Ascomycota. Entretanto, Basidiomycota, são difíceis de cultivar e particularmente difícil de identificar em cultura, então os métodos usados na maioria dos estudos de fungos cavernícolas são favoráveis a identificar Ascomycota. Mucoromycota são mais fáceis de detectar por causa de sua produção abundante de esporos e rápido crescimento, então a relativa abundância desse táxon no ambiente cavernícola pode ser superestimada. Os gêneros mais frequentemente reportados em estudos da micobiota cavernícola, a parte de *Histoplasma* e *Geomyces*, são: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Laboulbenia*, *Rhizopus*,

Mortierella, *Chaetomium*, *Rhachomyces*, entre outros. Existem espécies que foram isoladas exclusivamente em cavernas, como *Aspergillus spelunceus*, *Aspergillus thesauricus*, *Chrysosporium speluncarum*, *Chrysosporium chiropteroum*, *Microascus caviariformis*, *Mucor troglophilus*, *Ochroconis anomala*, *Ochroconis lascauxensis*, *Ombrophila speluncarum*, *Trichosporon akiyoshidainum*, *Trichosporon cavernícola*, *Trichosporon chiropterorum*, mas isso pode refletir amostragem insuficientes de ambientes externos as cavernas.

Em Zhang et al. (2020) 88% dos gêneros que identificaram pertenceram ao filo Ascomycota, 8% ao filo Basidiomycota, 1.9% ao filo Mucoromycota, 1.9% ao filo Mortierellomycota, 0.2% ao filo Glomeromycota. Os gêneros mais comumente isolados foram: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Arthrinium*, *Fussarium*, *Microascus*, *Mortierella*, *Cephalotrichum*, *Clonostachys*, e *Simplicillium*.

Também é possível destacar que alguns fungos como *Penicillium* spp., ou *Cladosporium* spp., podem colonizar ampla variedade de espécies de morcegos ou o abrigo que estes animais utilizam, o que explicaria sua alta frequência. Algumas espécies de fungos associados aos morcegos podem ter um potencial patogênico principalmente por habitarem ambientes como cavernas, grutas e ocos de árvores, ambientes que favorecem a propagação dos fungos (Furtado, 2018).

Cavernas geralmente não apresentam uma grande diversidade fúngica comumente encontrada em outro lugar na natureza. Uma exceção é a alta diversidade de fungo encontrados em guano nas cavernas. É notado que a diversidade de microrganismos e biomassa diminui da entrada para as zonas mais profundas das cavernas (Vanderwolf et al., 2013).

A respeito dos fungos que são verdadeiramente patógenos (fungos capazes de causar doenças em organismos imunossupressores) habitando ambientes subterrâneos, atenção especial tem sido dada ao fungo cavernícola termo-dimórfico *Histoplasma capsulatum*. Essa espécie causa histoplasmose (Taylor et al., 2013), que é uma infecção grave no sistema respiratório e sistêmico. Os sistemas variam de uma gripe suave (frequentemente

erradamente diagnosticado como uma gripe mais séria) a uma infecção disseminada e pode levar a morte.

Histoplasma capsulatum é comumente encontrado na forma filamentosa no meio ambiente, cresce em locais ricos em nitrogênio, com pH mais alto que 5 e produz macro e microconídios. Esse fungo é mais comumente encontrado no solo enriquecido com guano de pássaro ou morcego, dentro e fora das cavernas. No interior das cavernas já foram relatadas no guano, no sedimento, no ar, na água e nos morcegos (Vanderwolf et al., 2013).

No Brasil, como mostra Costa (2015), *H. capsulatum* pode ser encontrado em vários estados, como no Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso. Surtos da doença foram observados na cidade de Ouro Preto, no ano de 1976, onde vários espeleólogos foram infectados; em Pedro Leopoldo, no ano de 1997 e; um caso sem data especificada (aparentemente na década de 80) foi reportado na Gruta do Tamboril, em Unaí, sendo todos os casos relatados pertencentes ao estado de Minas Gerais.

Outras espécies são conhecidas por estarem associadas com infecções fúngicas oportunistas, como oncomicoses (*A. versicolor*, *A. ustus*, *F. solani* e *F. oxysporum*), otite humana (*A. flavus*, *A. japonicus*), micoses cutâneas (*P. lilacinum*), aspergilose pulmonar (*A. flavus*) e outras infecções fúngicas oportunistas (*F. solani* e *F. oxysporum*) (Taylor et al., 2013). *Cladosporium cladosporioides* e *C. herbarum* apesar de não serem consideradas patogênicas, produzem componentes extremamente alergênicos e podem causar problemas respiratórios para os visitantes das cavernas (Taylor et al., 2013).

Estudando uma reserva na Polônia com quase 38,000 morcegos de 12 espécies Kokurewicz et al. (2016) encontrou que mais fungos anemófilos foram isolados em corredores subterrâneos do que no ambiente externo. Esses autores também mostraram que a concentração fúngica aumenta quando o número de morcegos na caverna aumenta, demonstrando que morcegos são o fator primário que determina o número de fungos anemófilos em cavernas de hibernação.

A síndrome do nariz branco nos morcegos habitantes de cavernas na América do Norte em 2006, foram reportados com um fungo branco em seus narizes e asas. A síndrome do nariz branco é causada por um fungo, o *Pseudogymnoascus destructans*, antes conhecido como *Geomyces destructans* (Blehert et al., 2009). Dado os requerimentos de temperatura de *Pseudogymnoascus destructans* para seu crescimento ótimo, parece ser adaptado ao ambiente cavernícola. O fungo cresce em tecidos expostos de morcegos em hibernação, aparentemente causando despertar precoce, comportamento aberrante e perda prematura da reserva de gordura crítica (Blehert et al., 2009).

Em Cunha et al. (2020), a abundância e riqueza foi distinta para cada microhabitat (pelo, asa, cavidade oral), com a membrana da asa mostrando maior valor em ambos. O pelo e a pele de morcegos vivos pode apresentar surpreendentemente uma maior diversidade fúngica do que o solo de cavernas, o que pode ser explicado pelo movimento dos morcegos entre a superfície e os ambientes subterrâneos. Nos estados Unidos, asas de 30 morcegos de cinco hibernáculos foram encontrados dominados por *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Mortierella*, *Penicillium* e *Trichosporon*.

Em Holz et al. (2018) um grande número de fungos comumente reportados vivendo livremente no ambiente ou associado com plantas foram encontrados na pele ou no pelo de duas subespécies de morcegos de asa alada na Austrália. Os autores também mostraram que apesar de todos os morcegos que foram examinados carregavam fungos, a comunidade fúngica de alguns morcegos foram dominados por uma única espécie (*Aspergillus flavus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces roseus* ou *Ulocladium Chartarum*). Espécies de leveduras foram comumente isoladas dos morcegos e *R.mucilaginosa* foi a espécie mais frequentemente isolada. Uma nova espécie tolerante ao frio do gênero *Malassezia* foi identificada no pelo dos morcegos da subfamília Myotinae.

3 MATÉRIAS E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE COLETA

A caverna Furna do Morcego, considerada uma *bat cave*, se localiza no Parque Nacional do Catimbau (PARNA Catimbau) em Pernambuco. A caverna Furna do Morcego (fig.2) se localiza no município de Ibimirim, possui uma única entrada, apresenta um ambiente de arenito, com média de 30° C, 44 m de comprimento, área total de 200m². Possui colônias com dezenas de milhares de morcegos.

A caverna Furna do Morcego possui duas câmaras, câmara 1 e câmara 2, a câmara 1 é localizada perto da entrada da caverna, sofrendo influência do ambiente externo e possui maior luminosidade, já a câmara 2 é localizada mais internamente na caverna, onde os morcegos habitam, possuindo uma grande quantidade de guano, sofrendo menor influência do ambiente externo e é maior que a câmara 2, as coletas foram realizadas em ambas as câmaras.

Figura 2- Caverna Furna dos Morcegos



Fonte: Eder Barbier (2019)

3.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ANEMÓFILOS

Para isolamento dos fungos anemófilos foi utilizado o método de sedimentação em meio de cultura contido em placas (*gravity settling culture plate*

method). Placas de Petri de 90mm de diâmetro, contendo 20mL meios de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SAB) (quatro placas). As placas de Petri foram abertas a 1 m do chão por 20 minutos nas duas das câmaras da caverna (fig. 3), sendo quatro placas por câmara (Buttner; Stetzenbach, 1991). Em seguida, as placas foram identificadas e levadas (em caixa de isopor lacrada) para o Laboratório de pesquisa Taxonomia e Biotecnologia Utilizando Fungos, da Micoteca URM, do Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As placas foram incubadas, a 28°C por um período de 7 até 14 dias, no escuro. Após esse período, foi realizada a contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC) manualmente. Em seguida, as colônias foram purificadas (por meio de repiques em placas de Petri com 20mL de meio SAB), quando puras foram preservadas em solução aquosa de glicerol 30% (70% de água esterilizada e 30% de glicerol) em tubos estéreis de 2mL (1,5mL da solução de glicerol 30%) com tampa de rosca e mantidos a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ \text{C}$).

Figura 3- Hastes de sustentação confeccionadas para a coleta dos fungos anemófilos na caverna Furna dos Morcegos.



Fonte: Eder Barbier (2019).

3.3 ISOLAMENTO DOS FUNGOS DO GUANO INSETÍVORO

As amostras do guano insetívoro (10g), foram coletadas e acondicionadas em Eppendorf estéril e transportadas (em sacos plásticos dentro de uma caixa de isopor) para o Laboratório de pesquisa Taxonomia e Biotecnologia Utilizando Fungos, da Micoteca URM, UFPE. Para isolamento dos fungos, 1g de guano foi suspenso em 9 mL de água destilada esterilizada e agitado por 20 min a 100 rpm. Em seguida foram realizadas diluições seriadas até 10^{-4} . De cada suspensão 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , foi retirado 1 mL e realizado plaqueamento direto na superfície dos meios Infusão Cérebro-Coração (BHI) e SAB contidos em placas de Petri, e incubadas a 28 °C por até 14 dias no escuro. Após o crescimento, o número de UFC foi contado e as colônias foram purificadas (repiques em meio de cultura SAB) e preservadas em solução aquosa de glicerol 30% (70% de água para 30% de glicerol), acondicionadas em tubos com tampa de rosca de 2 mL, (onde 1,5mL é da solução glicerol 30%) e mantidos a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ \text{C}$).

3.4 ISOLAMENTO DOS FUNGOS DO CORPO DOS MORCEGOS

Para coleta dos fungos dos morcegos, foram realizados esfregaços a partir da cavidade oral, asas e pelos, utilizando cotonetes estéreis (Swabs) imersos em uma solução de 5mL de água destilada esterilizada, com adição de 0,1 mg de antibiótico cloranfenicol, contida em tubos Falcon de 15mL (Cunha et al., 2020). Foram coletadas as amostras de seis morcegos da espécie *Pteronotus gymnotus*, sendo uma fêmea e cinco machos, considerados adultos. Após amostragem, os Swabs foram identificados e acondicionados em caixas térmicas, e conduzidos para o para o Laboratório de pesquisa Taxonomia e Biotecnologia Utilizando Fungos, da Micoteca URM, UFPE.

Para o isolamento dos fungos, foi realizado o plaqueamento direto com esfregaço dos Swabs nas superfícies dos meios de cultura SAB (20mL) contidos em placas de Petri, sendo em seguida, incubadas por até 14 dias, no escuro, a 28 °C, e realizado a contagem e isolamento das UFC (Cunha et al., 2020). Após o isolamento, as culturas foram preservadas em solução aquosa de glicerol 30%

em tubos com tampa de rosca de 2 mL e mantidos a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ \text{C}$).

Culturas representativas dos isolados obtidos estão sendo depositadas na Micoteca URM/UFPE e lâminas permanentes no Herbário URM/UFPE.

3.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS

A caracterização morfológica foi realizada apenas para os isolados correspondentes às espécies novas. Para análise das características macroscópicas, os isolados foram cultivados em meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), Ágar Extrato de Malte (MEA), Ágar Pobre em Nutrientes (SNA) e Aveia-Ágar (OA) e incubados por 14 dias, a 28°C no escuro. Em seguida foram observados o aspecto, superfície, presença ou ausência de exsudato, cores do anverso, reverso e diâmetro das colônias. Para análise das características microscópicas, foram observadas em microscopia óptica as estruturas somáticas e reprodutivas. Para isto, foram montadas culturas sob lamínulas dos isolados e incubados por sete dias a 28°C em meio de cultura SNA.

3.6 OBTENÇÃO DO MICÉLIO PARA EXTRAÇÃO DO rDNA

A biomassa de todos os fungos isolados foi obtida a partir do cultivo em SAB contido em placa de Petri, mantidos a 28°C por cinco dias em ciclo natural de luz-escuro. Em seguida, o micélio foi transferido para microtubos de polipropileno de 2 mL com tampa de rosca, acrescidos de quatro esferas de vidro (3mm de diâmetro) e 300 microlitros da solução *Nuclei Lysis Solution* do Kit de extração de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) para maceração das células fúngicas, utilizando o equipamento L-Beater 6 (Loccus) e as etapas seguintes foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante do Kit.

3.7 PCR E SEQUENCIAMENTO

Amplificações de fragmentos do DNA foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Biociências, UFPE utilizando metodologia previamente estabelecida no Laboratório e seguindo literatura específica para os fungos isolados, seguindo Cunha et al. (2020).

Para identificação dos fungos, as reações de PCR foram realizadas de acordo com as condições e *primers* determinados em estudos prévios e dependendo do grupo de fungos a ser estudado (ex. Cunha et al., 2020). Para amplificar parte das regiões ITS do rDNA, foram utilizados os *primers* ITS1/ITS4 (White et al., 1990). Os produtos obtidos da amplificação foram purificados com utilização da enzima Exosapillustra™ ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences) e sequenciados na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento de DNA da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil).

3.8 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E ANÁLISE FILOGÉNÉTICA

As sequências de ITS de todos os isolados foram editadas no MEGA v. 6 (Tamura et al., 2013) e comparadas no banco de dados do GenBank – NCBI utilizando a ferramenta BLASTn. As sequências foram adicionadas ao conjunto de sequências de espécies similares obtidas do Genbank e alinhadas no programa online MAFFT v. 7 (Katoh & Standley, 2013) e ajustadas manualmente no MEGA v. 6 (Kumar et al., 2016). No alinhamento das sequências de ITS foi utilizado como grupo externo *Cunninghamella gigacellularis* URM 7400 e *Absidia caatinguensis* URM 7156 (Mucormycota).

Para os isolados de *Cladosporium*, incluindo as duas novas espécies, foram utilizadas sequências de ITS, ACT e TEF1. Dois conjuntos de dados foram construídos para as análises filogenéticas, um com as sequências das espécies do complexo *C. cladosporioides* (seguindo Freitas et al., 2021) e outro das sequências das espécies do complexo *C. sphaerospermum* (seguindo Bensch et al., 2018). Os alinhamentos para cada locus foram realizados usando o

programa online MAFT v. 7 e ajustes manuais foram feitos utilizando o programa MEGA v.7). No conjunto de dados do complexo *C. cladosporioides*, as espécies *C. sphaerospermum* (CBS193.54) e *C. longissimum* (CBS300.96) foram usadas como grupo externo; para o conjunto de dados do complexo *C. sphaerospermum* foi usado *Cercospora beticola* (CBS116456). Modelos de substituição de nucleotídeos foram estimados separadamente para cada gene utilizando MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). As análises de inferência Bayesiana (BI) (1×10^6 gerações, 25% de *burning* e cadeias foram amostradas a cada 1000 gerações) foram realizadas usando o programa MrBayes 3.2.7 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) no portal CIPRES Science Gateway (Miller et al. 2010). As análises de Máxima Verossimilhança (ML) (alinhamento de ITS de todos os isolados e *Cladosporium*) foram realizadas utilizando RAXMLHPC2 em XSEDE 8.2.12 (Stamatakis 2014; CIPRES Science Gateway Portal) com 1000 bootstrap e GTR+G+I como melhor modelo de substituição de nucleotídeos. O resultado das árvores foi visualizado no programa FigTree v. 1.4.4 e posteriormente editadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (UFC)

O número de UFC de fungos do ar da caverna Furna do Morcego variou entre as câmaras estudadas. No ar da câmara 1 foram observadas 49 UFC e na câmara 2, 144 UFC, esta variação também foi observada entre as partes do corpo dos morcegos, sendo no pelo encontrado cerca de 628 UFC de fungos, na asa 748 UFC e na boca 622 UFC. No guano dos morcegos 620 UFC de fungos foram observadas. Um total de 105 táxons foram identificados. O filo Ascomycota foi o mais comum, com 99 táxons, seguido pelo filo Basidiomycota com 6 táxons. O que concorda com Taylor et al. (2013), Rawat et al. (2017) e Cunha et al. (2020) que demonstraram que o filo Ascomycota foi mais frequente em ambientes cavernícolas. Dentre os Ascomycota foram isolados 28 gêneros, sendo os mais presentes *Aspergillus* (18 isolados) e *Cladosporium* (18), seguidos por *Penicillium* (8) e *Wickerhamomyces* (8). Outros 33 táxons também foram encontrados em menor quantidade, como *Fusarium* (6), *Diaporthe* (5), e alguns outros. Os 4 gêneros representantes do filo Basidiomycota foram *Rhodotorula*, *Ceriporia*, *Ceriporiopsis* e *Sakaguchia*. Em Taylor et al. (2013) e Rawat et al. (2017) o filo Basidiomycota também foi o segundo filo mais presente, só que com maior diversidade de táxons. Não foi encontrado nessa pesquisa nenhum táxon pertencente ao Filo Mucoromycota. O que difere da maioria das pesquisas cavernícolas onde poucos táxons desse filo são identificados. Por exemplo, em Cunha et al. (2020) identificaram um táxon pertencente ao filo Mucoromycota, do gênero *Rhizopus*.

4.2 FUNGOS ANEMÓFILOS

Das Câmaras 1 e 2 da caverna Furna do Morcegos foram identificados 32 e 31 táxons respectivamente. Dentre os táxons da Câmara 1, 12 corresponderam a *Cladosporium*, incluindo duas espécies novas para ciência. Conídios de espécies de *Cladosporium* são os componentes fúngicos mais isolados do ar, e várias espécies podem ser patogênicas, fitopatogênicas, causar deterioração e são cosmopolitas (Bensch et al., 2012), o que pode explicar a maior presença desse gênero na caverna. *Eutypella* com 3 táxons, *Fusarium* e *Meyerozyma* com 2 táxons cada. Também na câmara 1 foram isolados os gêneros *Aspergillus*,

Humicola, *Ceriporiopsis*, *Pseudothielavia*, *Malbranchea*, *Cystopora*, *Triangularia*, *Phaeosphaeria*, *Phoma*, *Deniquellata*, *Didymocrea*, e *Ceriporia* com um táxon cada. *Aspergillus* está entre os gêneros mais comumente encontrados em ambientes cavernícolas, o que pode explicar isso é o fato desse gênero ser cosmopolita, é se adaptar aos mais diversos ambientes. Já os outros gêneros não são comumente encontrados em cavernas ou outros ambientes subterrâneos.

Os gêneros *Pseudothielavia*, *Malbranchea*, *Cystopora*, *Triangularia*, *Phaeosphaeria*, *Phoma*, *Eutypella*, *Deniquelata*, *Didymocrea*, são sapróbios, encontrados no solo ou em plantas, muitas vezes sendo fitopatogênicos. O gênero *Beauveria* possui uma espécie muito conhecida pelo seu uso no controle biológico de pragas, a espécie *Beauveria bassiana*. A única levedura isolada na Câmara 1 pertence ao gênero *Meyerozyma*, que possui espécies, que são encontradas em diversos ambientes, incluindo hospitais, sendo assim patogênicas a imunossupressores (De Marco et al., 2018). 2 gêneros do filo Basidiomycota foram encontrados nessa Câmara, *Ceriporiopsis* e *Ceriporia*. Que são fitopatogênicos habitantes de madeira causando podridão branca (Wulandari et al., 2018), geralmente não são identificados em cavernas.

A Câmara 2, localizada mais internamente na caverna, com menor presença de luz solar e interferência do ambiente externo, apresenta maior concentração de morcegos. Dentre os 31 táxons isolados, *Aspergillus* foi o gênero mais presente (6 táxons), seguido por *Diaporthe* (4 táxons), *Cladosporium* (4 táxons), *Blastobotrys* (3 táxons), *Penicillium* (2 táxons), *Cystopora* (2 táxons), *Phoma* (2 táxons), *Paraconiothyrium* (2 táxons), *Wickerhamomyces*, *Fusarium*, *Eutypella*, *Gymnoascus*, *Phaeosphaeriopsis* e *Allocryptovalsa* (1 táxon). Diferente da Câmara 1, o gênero *Cladosporium* foi isolado em uma quantidade 4 vezes menor, e vários gêneros que não foram isolados na Câmara 1 foram isolados na Câmara 2, como é possível observar na tabela 1, provavelmente devido a diminuição da iluminação solar, da diferença de umidade e temperatura, sendo mais quente nessa câmara.

Diaporthe possui várias espécies endofíticas, com alta variabilidade genética (Santos et al., 2015), algumas que já foram encontradas na Caatinga, e em cavernas brasileiras como mostra Cunha et al. (2020). *Penicillium*, que junto com *Aspergillus* são os fungos filamentosos mais frequentemente isolados em cavernas (Taylor et al., 2013; Cunha et al., 2020), nesse trabalho não foram os mais frequentes, foi o gênero *Cladosporium*, mas ainda estão entre os mais frequentes. *Blastobotrys*, possui espécies de leveduras que são patogênicas, causando micoses invasivas (Kumar et al., 2014) e espécies que são utilizadas na produção de biodiesel (Thomas et al., 2019), só pela identificação molecular da região ITS, não tem como saber se essa espécie isolada na câmara 2 é patogênica. *Wickerhamomyces anomalus*, espécie identificada através do programa BLASTn, com 99% de identificação, usando marcador ITS, é encontrada em diversos habitats naturais e é utilizada em destilarias brasileiras na produção de cachaça (Cunha et al., 2020). *Phaeosphaeriopsis* tem espécies conhecidas por serem fitopatógenos, como a espécie *P. maydis* que causa mancha foliar no milho, sendo uma das principais doenças foliares do milho (Gonçalves et al., 2013).

Na Câmara 2, nenhum representante do filo Basidiomycota foi isolado, o que demonstra a diferença de uma câmara para outra, mesmo sendo na mesma caverna, gêneros diferentes foram isolados em somente uma das câmaras. A maioria são fitopatogênicos, algumas são patogênicos aos visitantes da caverna ou aos morcegos. A câmara 1 apresentou mais táxons e mais gêneros do que a câmara 2, como é possível observar no gráfico 1. Vários dos gêneros nunca foram reportados em cavernas, como é possível observar em Vanderwolf et al. (2013). A diferença na luminosidade e na temperatura, sendo mais úmido e escuro na câmara 2, influência no crescimento desses fungos. Aparentemente um grupo geral de fungos são encontrados em ambientes cavernícolas, acompanhados de várias espécies que são raramente isoladas (Vanderwolf et al., 2013).

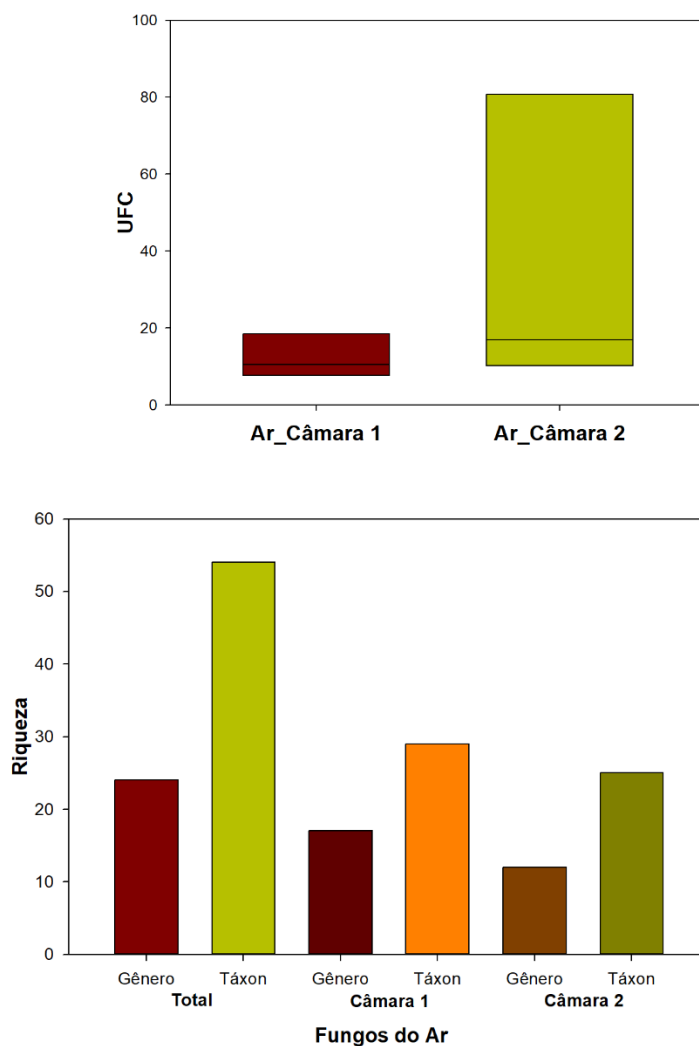
Tabela 1- Distribuição dos fungos isolados do ar nas câmaras da Caverna Furna dos Morcegos

TÁXONS	CÂMARA 1	CÂMARA 2
<i>Cladosporium</i>	12	4
<i>Deniquellata</i>	1	0
<i>Paraconiothyrium</i>	0	2
<i>Aspergillus</i>	1	6
<i>Humicola</i>	1	0
<i>Meyerozyma</i>	2	0
<i>Ceriporiopsis</i>	1	0
<i>Beauveria</i>	1	0
<i>Didymocrea</i>	1	0
<i>Ceriporia</i>	1	0
<i>Eutypella</i>	3	1
<i>Pseudothielavia</i>	1	0
<i>Malbranchea</i>	1	0
<i>Cystopora</i>	1	2
<i>Triangularia</i>	1	0
<i>Fusarium</i>	2	1
<i>Phaeosphaeria</i>	1	0
<i>Phoma</i>	1	2
<i>Blastobotrys</i>	0	3
<i>Diaporthe</i>	0	4
<i>Allocryptovalsa</i>	0	1
<i>Penicillium</i>	0	2
<i>Gymnoascos</i>	0	1
<i>Wickerhamomyces</i>	0	1
<i>Phaeosphaeriopsis</i>	0	1

Autora: Mayara Luiza (2021)

A câmara 1 apresentou maior riqueza do que a câmara 2, já a câmara 2 apresentou maior abundância do que a câmara 1, como é possível observar no gráfico 1. O que significa que o mesmo gênero de fungo apresentou um maior número de táxons, como foi o caso do gênero *Aspergillus*.

Gráfico 1- Abundância/Riqueza dos gêneros de fungos isolados do ar das câmaras da Caverna Furna do Morcegos



Autor: Eder Barbier (2021)

Esse trabalho está de acordo com Furtado (2018), Taylor et al. (2013), Rawat et al. (2017) e Cunha et al. (2020). Que os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, e *Cladosporium* são frequentemente encontrados em ambientes cavernícolas. São gêneros generalistas, estando presente em diversos ambientes e substratos.

4.2.1 Duas novas espécies de *Cladosporium*

Neste estudo, estão sendo descritas duas novas espécies de *Cladosporium* com base em características macroscópicas, microscópicas e filogenéticas utilizando sequências de DNA. A reconstrução filogenética foi realizada através das análises de Máxima Verossimilhança (MV) e Interferência Bayesiana (IB) utilizando uma matriz de genes ITS, ACT e TEF1 (mais detalhes no anexo a).

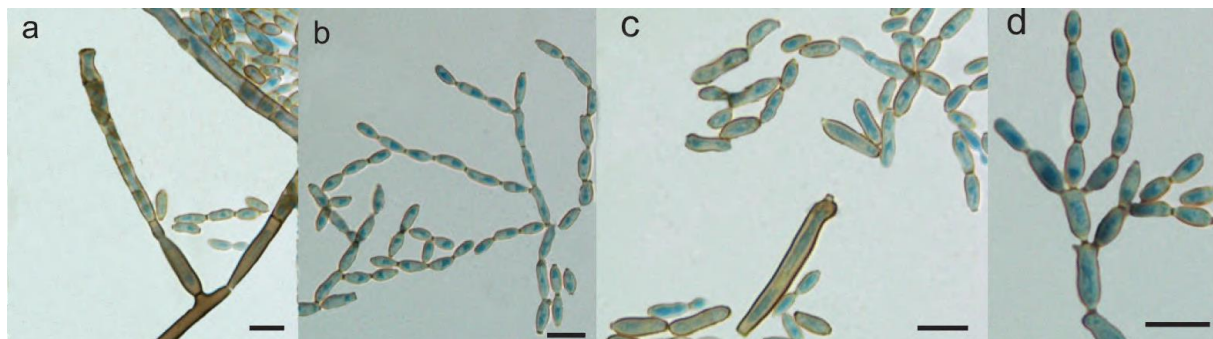
O gênero *Cladosporium* foi estabelecido por Link em 1816 e os estudos de revisão de *Cladosporium herbarum* s. lat. (Schubert et al., 2007b), *C. sphaerospermum* s. lat. (Zalar et al., 2007; Dugan et al., 2008) e *C. cladosporioides* s. lat. (Bensch et al., 2010), mostram que essas espécies sapróbicas são consideradas complexos heterógenos, composto por espécies diferenciadas amplamente pela sua genética e morfologia (Bensch et al., 2012).

Pesquisas utilizando a ferramenta BLASTn no GenBank, mostrou que sequências das duas espécies novas são relacionadas com o complexo *C. cladosporioides*. Inferência filogenética posicionou a nova espécie *Cladosporium* sp. nov. 1. em um clado relacionado com *C. anthropophilum* e *C. puris* e a outra espécie nova *Cladosporium* sp. nov. 2 foi posicionada como uma linhagem única no mesmo clado que *C. crousii*, *C. endoviticola* e *C. pseudocladosporioides*. Espécies nesse complexo são caracterizadas pela presença de conidióforos ramificados ou não, levemente cilíndrico, com conídios ovóides ou elipsoidais (Bensch et al., 2012).

- *Cladosporium* sp. nov. 1, M.L.S. Pereira, J.D.P. Bezerra & C.M. Souza-Motta.

Dois isolados dessa espécie foram identificados do ar da câmara 1, possui micélio superficial abundante, ocasionalmente imerso, hifas ramificadas, 2–3 µm, septadas e hialinas, com coloração verde oliva. Conidióforos solitários (fig.4a), eretos, sem nódulos, usualmente septados, de coloração de marrom claro a escuro, até 850 X 2-4 µm. Células conidiogênicas integradas, apresenta ramoconídios primários (fig.4d), cilíndricos-oblongo, pálidos verdes olivas, septados, com base truncada, 15-42 X 2-5 µm. E ramoconídios secundários (fig.4c) elipsoides, subcilíndricos ou cilíndricos-oblongo, 8-23 X 2-5 µm. Conídios (fig.4b) formados em longas cadeias ramificadas, asseptados, ramificados em todas direções, conídios terminais oblongos, subhialino ou usualmente pigmentados, 4.5-8.5 X 3.2-4 µm, conídios intercalares elipsoides, subcilíndricos, 5.5- 15 X 2-3.5 µm.

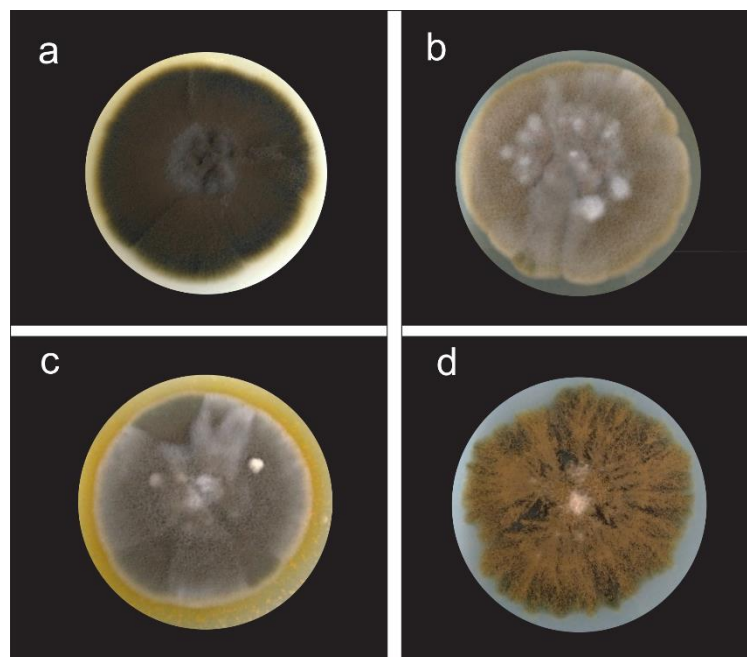
Figura 4- *Cladosporium* sp. nov. 1 a. Conidioforo, b. Cadeia de conídios, c. Ramoconídio, d. Ramoconídio e conídios. Barra de escala 10 μ m



Fonte: Mayara Luiza (2021)

Características da cultura: As colônias cresceram por 14 dias a 28°C em meio BDA, SNA, MEA e OA. Colônias no meio BDA (fig.5a) cresceram até 60mm de diâmetro, coloração verde escuro, ou verde oliva, aveludadas, reverso verde escuro ou marrom escuro. Micélio aéreo denso, formando tapetes baixos, sem exsudatos proeminentes. As colônias em MEA (fig.5b), com 64mm de diâmetro, de coloração verde claro ou verde oliva, micélio aéreo verde oliva, reverso verde escuro, cobrindo quase toda a colônia, as margens levemente marrom, aveludada ou flocosa. Colônias em AO (fig.5c), com 65mm de diâmetro, cinza oliva, as margens verde oliva ou verde escuro, aveludada, reverso amarelo esverdeado. Micélio aéreo amarelado com um halo amarelo neon ao redor da cultura. Colônias em SNA (fig.5d), com 58mm de diâmetro, marrom escuro ou verde escuro, reverso verde escuro, micélio aéreo espalhado, aveludado, crescendo liso.

Figura 5- Colônias de *Cladosporium* sp. nova 1 em a. Batata Dextrose Ágar (BDA), b. Ágar Extrato de Malte (MEA), c. Aveia-Ágar (OA), d. Ágar Pobre em Nutrientes (SNA) por 14 dias em 28°C



Fonte: Mayara Luiza (2021)

- *Cladosporium* sp. nov. 2, M.L.S. Pereira, J.D.P. Bezerra & C.M. Souza-Motta.

Espécie isolada da câmara 1, micélio abundante, ocasionalmente imerso, hifas ramificadas, 1–3 μm , septadas as vezes verrucosas, subhialinas ou pálido marrom oliva. Conidióforos solitários (fig.6a, b), crescendo apicalmente e lateralmente da hifa, reto, cilíndrico-oblongo, sem nódulos, septados, pálido até marrom escuro, 13–470 $\times$ 2–5.2 μm . Células conidiogênicas integradas, apresentam ramoconidio (fig.6c) cilíndricos-oblongos, verde oliva pálido, levemente engrossados, base truncada, 12.5–28 $\times$ 5–6.5 μm . Ramoconídios secundários elipsoides-ovoides, subcilíndricos ou cilíndricos-oblongo (6.5–)8–13(–18) $\times$ (5–)6.5–8(–9) μm . Conídios (fig. 6d) solitários, ramificados ou não, numerosos, conídio terminal obovoide ou elipsoide, ocasionalmente subgloboso, subhialino ou marrom, 7.5–8.5 $\times$ 3–5.4 μm . Conidio intercalar elipsoide ou subcilíndrico 7.5–11 $\times$ 3.5–6 μm .

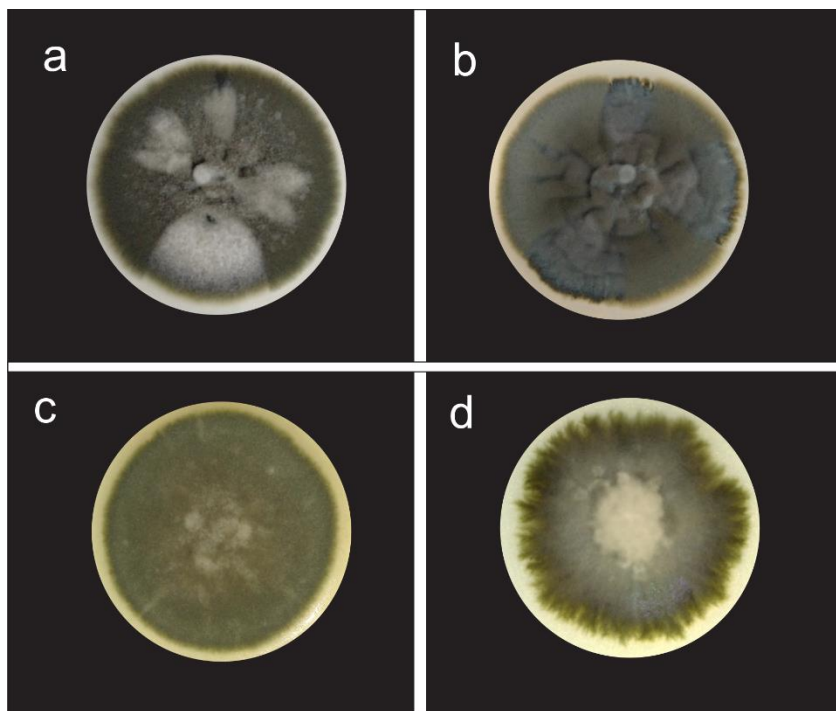
Figura 6- *Cladosporium* sp. nov. 2, a. Conidióforo com conídios, b. Conidióforo, c. Ramoconidio com conídios, d. cadeia de conídios. Barra de escala: 10 μ m



Fonte: Mayara Luiza (2021)

Características da cultura: Culturas em meio BDA, SNA, MEA e OA, por 14 dias em 28°C. Colônia em BDA (fig.7a), com 74mm de diâmetro, verde escuro, cinza oliva, ou preto oliva, aveludada, margens verde oliva ou verde escuras, reverso verde escuro ou verde oliva escuro. Micélio aéreo esparsos, formado abundantemente, branco ou cinzento, formando partes cinzentas esbranquiçadas, sem exsudatos. Colônia em MEA (fig.7b), com 70mm de diâmetro, verde oliva ou verde amarelado, flocoso, reverso verde escuro, micélio aéreo esparsos, difuso ou flocoso, sem exsudatos. Colônias em OA (fig.7c), com 65mm de diâmetro, verde oliva, margens verde-escuras, reverso verde escuro ou marrom oliva, micélio aéreo aveludado, denso, liso, sem exsudatos. Colônias em SNA (fig.7d), com 60mm de diâmetro, cinza ou verde oliva, aveludada, reverso cinza chumbo ou verde escuro, margens verde-claras, micélio aéreo formando largas partes esbranquiçadas ou cinzentas, aveludado, com exsudato.

Figura 7- Colônias de *Cladosporium* sp. nova 2 em a. Batata Dextrose Ágar (BDA), b. Ágar Extrato de Malte (MEA), c. Aveia-Ágar (OA), d. Ágar Pobre em Nutrientes (SNA) por 14 dias em 28°C



Fonte: Mayara Luiza (2021)

4.3 FUNGOS ISOLADOS DO CORPO DOS MORCEGOS

Levando em conta as três áreas do corpo dos 6 espécimes dos morcegos, temos 26 táxons, 11 táxons da asa, 6 da cavidade oral, e 9 do pelo, como mostra a tabela 2. Sendo 23 pertencentes ao filo Ascomycota e 3 ao filo Basidiomycota. Os 3 táxons do filo Basidiomycota, foram os gêneros *Rhodotorula*, isolado da asa, o que vai de acordo com Cunha et al. (2020), que *Rhodotorula* também foi isolado na asa. O gênero *Sakaguchia*, isolado do corpo e o gênero *Ceriporia* isolado da cavidade oral. *Rhodotorula* não foi isolado do ar da caverna, e possui várias espécies associadas a dermatomicoses e micoses sistêmicas, patógeno também para animais (Rosa et al., 2018). *Aspergillus* e *Wickerhamomyces* foram os gêneros mais isolados, com 7 táxons cada, *Wickerhamomyces* foi isolado nos três micro-habitats, já *Aspergillus* não foi isolado na cavidade oral. *Cladosporium* com 2 táxons foi isolado no pelo e na asa, *Fusarium*, com 2 táxons, foi isolado somente na asa, *Diaporthe* e *Penicillium*, foram isolados na asa de dois

espécimes diferentes. Na região da boca foram isolados gêneros que não foram isolados do ar, como o gênero *Hypoxyton*, que é um fungo endofítico e sapróbio, encontrado em madeira morta, usado em estudos como bioprospecção, com potencial antitumoral (Silva, 2018).

Tabela 2-Tabela dos gêneros dos fungos identificados do corpo dos morcegos

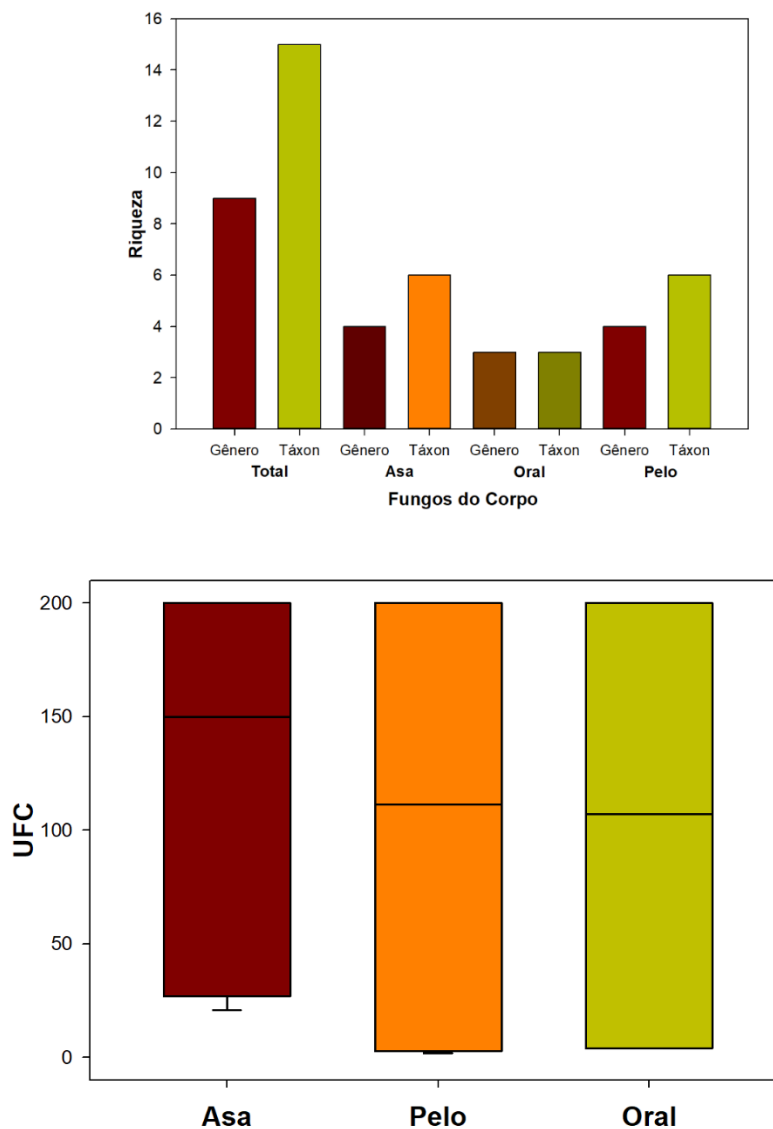
GÊNERO	ASA	PELO	ORAL
<i>Rhodotorula</i>	X		
<i>Diaporthe</i>	X		
<i>Ceriporia</i>			X
<i>Hypoxyton</i>			X
<i>Sakaguchia</i>		X	
<i>Aspergillus</i>	X	X	
<i>Blastobotrys</i>		X	
<i>Fusarium</i>	X		
<i>Wickerhamomyces</i>	X	X	X
<i>Cladosporium</i>	X	X	
<i>Penicillium</i>	X		
<i>Deniquelata</i>	X		

Autora: Mayara Luiza (2021)

O gênero *Wickerhamomyces* foi o único gênero presente nos três micro-habitats, e em um dos espécimes dos morcegos foi o único gênero isolado. Sendo a espécie *W. anomalus* sendo 5 dos 7 táxons identificados, de acordo o programa BLASTn, onde a per identification foi de 99%. Também com 99% de per identification, usando os marcadores ITS e LSU, na forma de levedura, foi a espécie *P. citrinum*, que é um patógeno humano, causando problemas respiratórios (Hesse et al., 2017).

Os três micro-habitats coletados apresentaram abundância parecida, no pelo sendo um pouco maior. A cavidade oral apresentou menor riqueza, do que o pelo e a asa, como é possível observar no gráfico 2.

Gráfico 2- Abundância/Riqueza dos fungos isolados do corpo dos morcegos



Autor: Eder Barbier (2021)

A espécie *P.gymnonotus* é insetívora, e deve ter entrado em contato com alguns dos esporos dos gêneros isolados quando estavam se alimentando ou voando ao entrar em contato com algumas plantas e com o solo. Não existem estudos suficientes de fungos associados ao corpo dos morcegos para comprovar essa teoria.

Em relação aos outros substratos coletados, os micros habitats do corpo dos morcegos apresentou uma maior concentração de leveduras, provável porque crescem em uma temperatura mais alta, como a temperatura corporal dos morcegos ($\sim 36^{\circ}\text{C}$), e em substratos mais úmidos, como a cavidade oral.

4.4 FUNGOS ISOLADOS DO GUANO INSETÍVORO

As amostras do guano, somente guano insetívoro, não tinha outros tipos de guano presentes na caverna na hora da coleta, foram coletadas nas duas câmaras, e isoladas nos meios de cultura BHI e SAB. Em BHI foram 581 UFC, e no meio SAB 40 UFC e 16 táxons ao todo, com o meio BHI foram isolados 4 táxons, *Aspergillus* (2 táxons), *Penicillium* (1 táxon) e *Fusarium* (1 táxon). Através do programa BLASTn, com 99% de per identification, foi possível identificar a espécie de *Fusarium*, *F. solani*. Que é um fitopatógeno, causando podridão de raízes, por exemplo na pimenteira-do-reino (Rocha et al., 2016). Com o meio SAB foram isolados 12 táxons, *Penicillium* (4 táxons), um sendo a espécie *P.citrinum* que também foi isolada na asa, *Aspergillus* (2 táxons), *Candida* (2 táxons), *Allocryptovalsa*, *Dichotomopilus*, *Arcopilus* e *Metschnikowia* (1 táxon cada), como é possível observar na tabela 3.

Tabela 3-Tabela dos gêneros dos fungos identificados do guano insetívoro

GÊNERO	BHI	SAB
<i>Aspergillus</i>	X	X
<i>Allocryptovalsa</i>		X
<i>Candida</i>		X
<i>Penicillium</i>	X	X
<i>Fusarium</i>	X	
<i>Dichotomopilus</i>		X
<i>Arcopilus</i>		X
<i>Metschnikowia</i>		X

Autora: Mayara Luiza (2021).

As mesmas amostras foram isoladas nos dois meios, mas as amostras que foram isoladas em BHI, a maioria não ampliou durante a PCR, por isso não foi possível sua identificação.

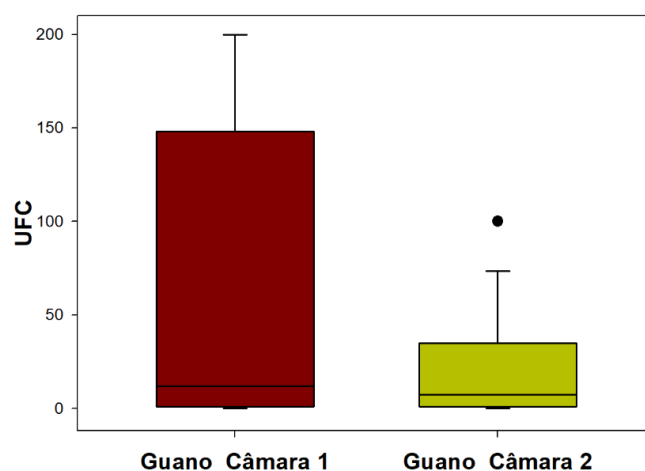
Candida, *Dichotomopilus*, *Arcopilus*, *Metschnikowia* foram somente isolados no guano. Provavelmente porque o guano apresenta maior matéria orgânica que os outros substratos e depositado no solo, sendo mais uma fonte de nutrientes. *Candida* é um patógeno humano bem conhecido, o que representa um risco aos visitantes da caverna ao entrarem em contato com os esporos das

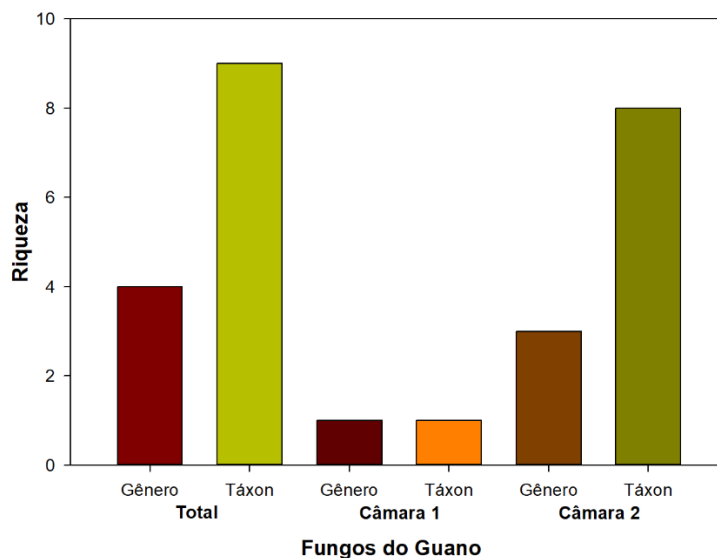
espécies desse gênero. Difere de Cunha et al. (2020), onde *Candida* foi encontrada nas amostras dos morcegos e não do guano.

Muitas espécies não *Saccharomyces* têm sido utilizadas como leveduras alternativas na produção de vinhos porque possuem propriedades sensoriais que são distintas em comparação aos vinhos produzidos utilizando somente *Saccharomyces cerevisiae* como o inóculo clássico. *Metschnikowia* é um do gênero mais investigado como levedura de vinho, graças a sua ocorrência em diversos ambientes e seu impacto na produção de vinhos, tem sido encontrada em uvas, videiras, moscas de frutas e fermentações de vinhos como parte residente da microbiota de vinícolas e equipamento de fabricação de vinho (Vicente et al., 2020).

As espécies de *Arcopilus*, previamente identificadas como *Chaetomium*, são notáveis por sua aplicabilidade na agricultura como agentes de controle de fitopatogênicos e como produtos comerciais. A atividade antifúngica desse gênero está associada com a habilidade de produzir vários metabolitos secundários, especialmente policetídeos (Sousa et al., 2020). Tem a chance de ser uma nova espécie e um primeiro registro desse gênero em cavernas, já que atualmente possui somente 7 espécies identificadas (Sousa et al., 2020), mas é necessário mais teste morfológicos e moleculares para confirmar essa possibilidade.

Gráfico 3- Abundância/Riqueza dos fungos isolados do guano insetívoro





Autor: Eder Barbier (2021).

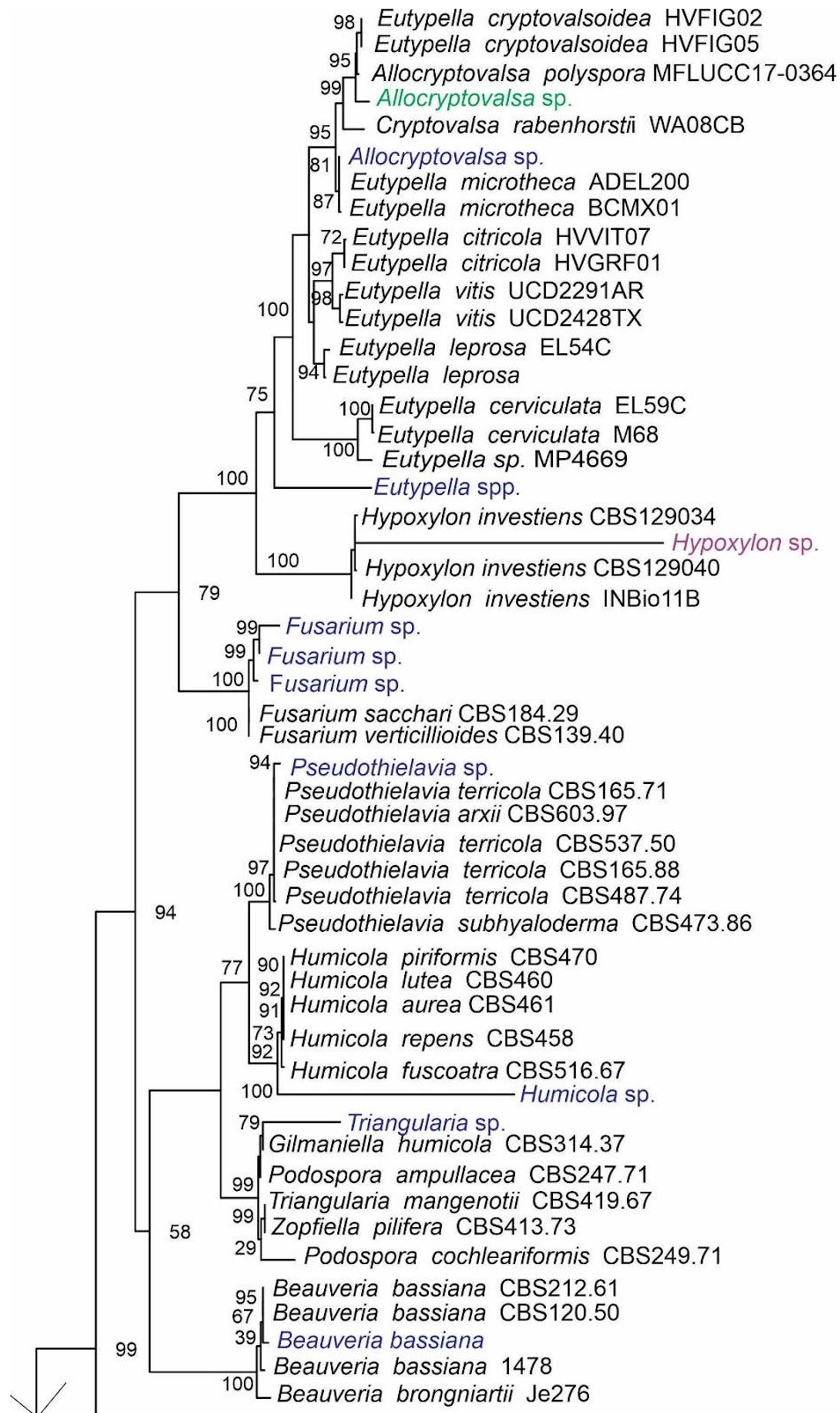
Em relação as câmeras, a câmara 1 apresentou maior abundância, mas menor riqueza do que a câmara 2, como mostra o gráfico 3, o que pode estar relacionado a idade do guano depositado, na câmara 2 o guano estava mais fresco que é onde se encontra a maior concentração de morcegos.

4.5 IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS

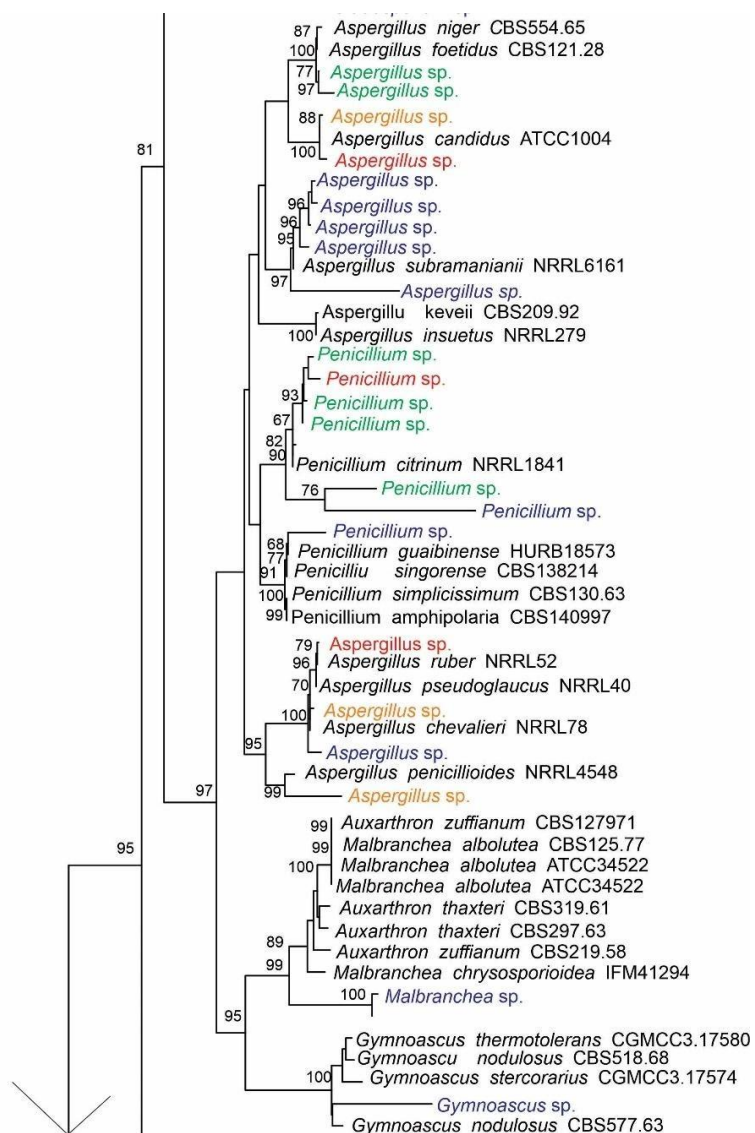
Os isolados foram previamente avaliados com bases em características macro e microscópicas das colônias e com base de sequências de ITS do rDNA. Para confirmar os resultados obtidos nas análises no BLASTn, foram realizadas análises filogenéticas baseadas em ML, que confirmou que os isolados obtidos no presente estudo pertencem aos filos Ascomycota e Basidiomycota.

Um total de 79 sequências dos fungos isolados no estudo foram utilizadas nas análises filogenéticas. A árvore filogenética baseada em ML (fig. 10) mostrou a presença de 25 gêneros nos isolados do ar, 4 nos isolados do guano e 9 gêneros nos três micro-habitat do corpo dos morcegos. Com alguns dos gêneros sendo fungos fitopatogênicos e com potencial de patógenos humanos. A análise das sequências de DNA dos isolados obtidos demonstrou que não foram observados fungos dos gêneros *Histoplasma* e *Geomyces* que estavam entre os objetivos dessa pesquisa.

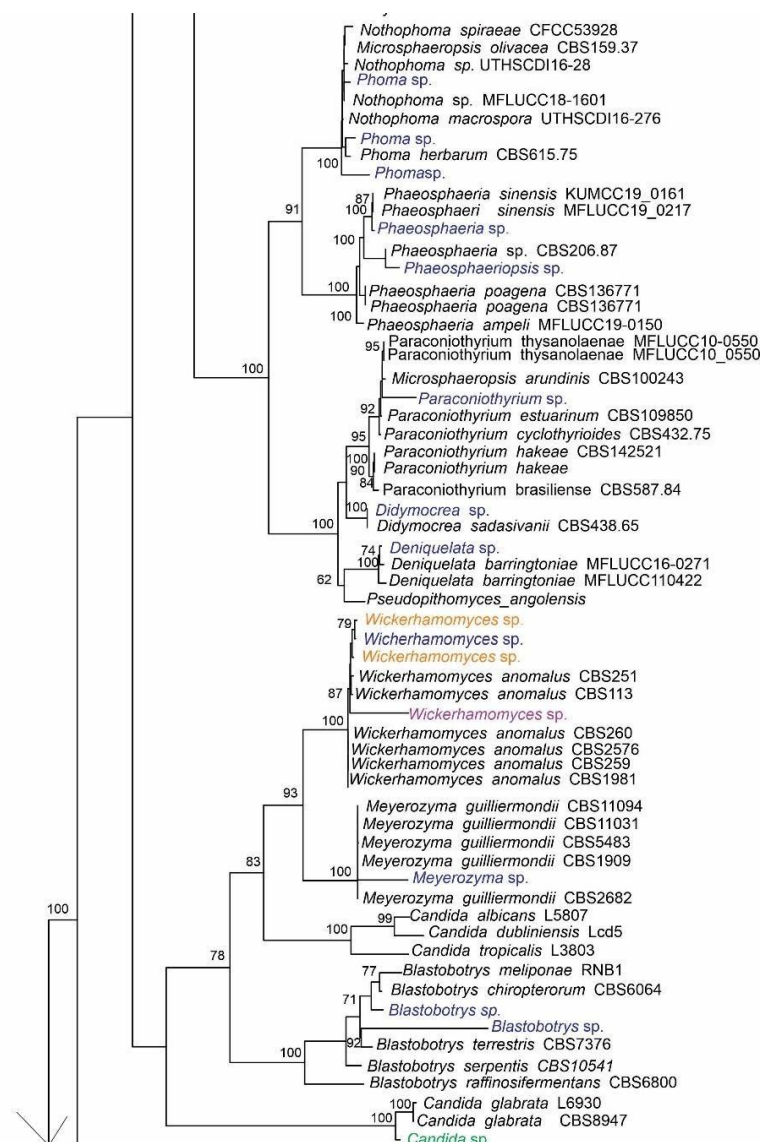
Figura 8- Árvore filogenética com base em máxima verossimilhança utilizando sequências de ITS do rDNA. Isolados obtidos no presente estudo estão identificados com diferentes cores: azul são isolados do ar, verde isolados do guano, vermelho isolados da asa, laranja isolados do pelo e roxo isolados da cavidade oral dos morcegos. *Cunninghamella gigacellularis* URM 7400 e *Absidia caatinguensis* URM 7156 foram utilizadas como grupo externo.



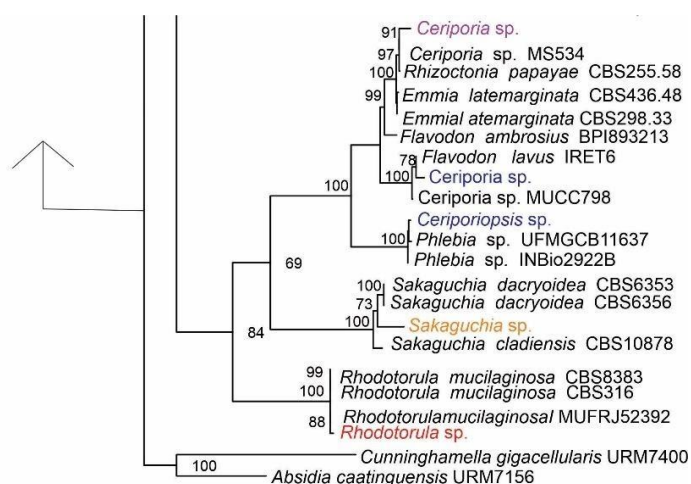
Ascomycota



Ascomycota



Basidiomycota



0.3

5 CONCLUSÕES

A caverna Furna do Morcego, em área de Caatinga no Parque Nacional Vale do Catimbau, possui uma riqueza de fungos que demonstra a importância dela para preservação da diversidade biológica e pesquisas espeleológicas.

Durante esse estudo foi possível identificar isolados fúngicos obtidos das amostras do ar das duas câmaras da caverna. *Cladosporium* e *Aspergillus* são os gêneros como a maior parte dos táxons identificados, incluindo duas novas espécies de *Cladosporium*.

64 gêneros foram isolados no ar, 16 do guano, 11 da asa, 6 da cavidade oral e 9 do corpo do morcego. Este fato demonstra como os fungos são capazes de habitar diferentes substratos/ambientes/hospedeiros da caverna. Isolados/táxons do gênero *Aspergillus* foram identificados em todos os substratos coletados, exceto na cavidade oral.

Em todas as áreas coletadas foram isolados e identificados gêneros de importância médica, fitopatogênica e industrial.

Mais análises são necessárias para identificação das espécies para ter certeza se são possíveis patógenos e se podem ter alguma aplicação biotecnológica.

REFERÊNCIAS

- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. 2012. **The genus *Cladosporium***. *Studies in Mycology*. 72: 1–401.
<https://doi.org/10.3114/sim0003>
- Bensch, K., Groenewald, J.Z., Meijer, M., Dijksterhuis, J., Jurjevi, Z., Andersen, B., Houbaken, J., Crous, P.W., Samson, R.A. 2018. ***Cladosporium* species in indoor environments**. *Studies in Mycology*. 89: 177–301.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.03.002>
- Blehert, D.S., Hicks, A.C., Behr, M., Meteyer, C.U., Berlowski-Zier, B.M., Buckles, E.L., Coleman, J.T.H., Darling, S.R., Gargas, A., Niver, R., Okoniewski, J.C., Rudd, R.J., Stone, W.B. 2009. **Bat white-nose syndrome: an emerging fungal pathogen?** *Science*. 323(5911):227.
<https://doi.org/10.1126/science.1163874>
- Costa, F. L. B. **Identificação de fungos isolados de cavidades naturais subterrâneas do Parque Estadual do Sumidouro**. 2015. 123 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2015.
- Cunha, A.O.B., Bezerra, J.D.P., Oliveira, T.G.L., Barbier, E., Bernard, E., Machado, A.R., Souza-Motta, C.M. 2020 **Living in the dark: Bat caves as hotspots of fungal diversity**. *PLoS ONE*. 15: 0243494.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243494>
- Crous, P.W., Luangsa-ard, J.J., Wingfield, M.J., Carnegie, A.J., Hernández-Restrepo, M., Lombard, L. et al., 2018. **Fungal Planet description**. *Persoonia*. 41: 238–417. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.12>
- Edgar, R.C. 2004. **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput**. *Nucleic Acids Res*. 32(5):1792-7.
- Feijó, A., Rocha, P.A. 2017. **Morcegos da estação ecológica Aiuaba, Ceará, Nordeste do Brasil: uma unidade de proteção integral na Caatinga**. *Mastozoología Neotropical*.
- Furtado, B. G. **Composição de fungos filamentosos em *Molossus molossus* (Pallas, 1766) (Chiroptera: Molossidae) em ambiente de Mata Atlântica**. 2018. 38 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Centro de Biociências, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2018.

- Freitas, M.L.R., Gomes, A.A.M., Rosado, A.W.C., Pereira, O.L. 2021. **Cladosporium species from submerged decayed leaves in Brazil, including a new species and new records.** Phytotaxa. 482(3). <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.482.3.1>
- Gonçalves, R. M., Figueiredo, J. E. F., Pedro, E. S., Meirelles, W. F., Leite, J. R. P., Sauer, A. V., Costa, R. V., Cota, L. V., Silva, D. D., Pacola-meirelles, L. D. 2013. **Mancha-foliar-de-Phaeosphaeria (mancha-branca-do-milho): fungo ou bactéria?** Boletim de pesquisa e desenvolvimento. 79:1-38
- Glass N.L.; Donaldson G.C. 1995. **Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes.** Appl Environ Microbiol. 61:1323–1330.
- Hesse, S.E., Luethy, P.M., Beigel, J.H., Zelazny, A.M., **Penicillium citrinum: Opportunistic pathogen or idle bystander? A case analysis with demonstration of galactomannan cross-reactivity.** 2017. Medical Mycology Case Reports. 17: 8-10. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2017.05.003>
- Holz, P.H., Lumsden, L.F., Marenda, M.S., Browning, G.F., Hufschmid, J. **Two subspecies of bent-winged bats (*Miniopterus orianae bassanii* and *oceanensis*) in southern Australia have diverse fungal skin flora but not *Pseudogymnoascus destructans*.** 2018. PLoS ONE. 13: e0204282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204282>
- Katoh, K., Standley, D.M. 2013. **MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability.** Molecular Biology and Evolution. 30 :772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kokurewicz, T., Ogońrek, R., Pusz, W., Matkowski, K. 2016 **Bats increase the number of cultivable airborne fungi in the “Nietoperek” bat reserve in Western Poland.** Microb Ecol. 72: 36–48. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0763-3>
- Kumar, A., Babu, R., Bijulal S., Abraham, M., Sasidharan, P., Kathuria, S., Sharma, C., Meis, J.F., Chowdhary, A. 2014. **Invasive mycosis due to species of *Blastobotrys* in immunocompromised patients with reduced susceptibility to antifungals.** Journal of Clinical Microbiology. 52(11). <https://doi.org/10.1128/JCM.01977-14>
- Kumar, A., Birnbaum, M.D., Patel, D.M., Morgan, W.M., Singh, J., Barrientos, A., Zhang, F. 2016. **Posttranslational arginylation enzyme Ate1 affects DNA mutagenesis by regulating stress response.** Cell Death Dis. 7(9): e2378. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.284>

- Ladle, R.J., Firmino, J.V.L., Malhado, A.C.M., Rodríguez-Durán, A. 2012. **Unexplored Diversity and Conservation Potential of Neotropical Hot Caves**. *Conservation Biology*. 26(6): 978-982. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2012.01936.x>
- Miller, A., Chen, J., Takasuka, T.E., Jacobi, J.L., Kaufman, P.D., Irudayaraj, J.M., Kirchmaier, A.L. 2010. **Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is required for cell cycle-regulated silent chromatin on replicated and nonreplicated genes**. *J Biol Chem*. 285:35142-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.166918>
- Molinari, J., Aguirre, L., Arroyo Cabrales, J., Alvarez Castaneda, S.T., Cuarón, A.D. & de Grammont, P.C. 2008. ***Pteronotus gymnonotus***. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Nylander, J.A.A. 2004. **MrModeltest v2. Program distributed by the author**. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Otálora-Ardila, A., Torre, J.M., Barbier, E., Pimentel, N.T., Leal, E.S.B.L., Bernard, E. 2020. **Thermally-Assisted Monitoring of Bat Abundance in an Exceptional Cave in Brazil's Caatinga Drylands**. *Acta Chiropterologica*. 21(2):411-423. <https://doi.org/10.3161/15081109ACC2019.21.2.016>
- Pavan, A.C.D. **Sistemática e história evolutiva do gênero de morcegos neotropical *Pteronotus* (Chiroptera: Mormoopidae)**. 2014. 219 f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- Pavan, A.C., Tavares, V.C. 2020. ***Pteronotus gymnonotus* (Chiroptera: Mormoopidae)**. *Mammalian Species*. 52(990):40–48. <https://doi.org/10.1093/mspecies/seaa003>
- Posada, D., Buckley, T.R. 2004. **Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests**. *Systematic Biology*. 53: 793–808.
- Pusz, W.; OGÓRE, R.; Knapik, R.; Kozak, B.; Bujak, H. 2014. **The occurrence of fungi in the recently discovered Jarkowicka cave in the Karkonosze Mts. (Poland)**. *Geomicrobiology Journal*. 32: 59- 67.
- Rambaut. FigTree version 1.3.1 [computer program]. 2009.
- Rannala, B., Yang, Z. 1996. **Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference**. *Journal of Molecular Evolution*. 43: 304–311.

Rawat, S.; Rachn, R.; Johri, B.N. 2017. **Fungal world of cave ecosystem**. Springer Nature Singapore.7: 99-124.

Rocha, F.S., Ferreira, G.H.S., Silva, T.C.S.R., Amaral, F.L., Muniz, M.F.S., Pereira, E.A. **Caracterização de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, produção de fitotoxina e incidência da fusariose no norte de Minas Gerais**. 2016 Summa Phytopathologica. 42: 67-72. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2100>.

Ronquist, F., Heulsenbeck, J.P. 2003. **MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models**. Bioinformatics. 19: 1572–1574.

Rosa, J.M.A., Moraes, D.F.S.D., Lima, S.R., Neves, R.C.S.M., Colodel, E.M., Almeida, A.B.P.F., Sousa, V.R.F., Nakazato, L., Dutra, V. 2018. **Fungal dermatitis associated to *Rhodotorula glutinis* in dog (*Canis familiaris*): case report**. Medicina veterinária. 70(2). <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9573>

R Development Core Team. 2017. **A language and environment for statistical computing**. Vienna, The R Foundation for Statistical Computing, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture of the University of the Free State.

Santos, A. D. **Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* associado a alga marinha *Asparagopsis taxiformis*: potencial antifúngico,anticolinesterásico e antitumoral**. 2016. 151 f. Dissertação (Mestrado em Química)- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2016.

Sousa, F.T., Santos, A.O., Silva, F.M.A., Caniato, F.F., Queiroz, C.A., Souza, T.M., Maciel, J.B.S, Catarino, A.M., Koolen, H.H.F., Silva, G.F. 2020. ***Arcopilus amazonicus* (Chaetomiaceae), a new fungal species from the Amazon rainforest native plant *Paullinia cupana***. Phytotaxa. 456 (2): 145-156. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.456.2.2>

Sugita, T.; Kikuchi, K.; Makimura, K.; Urata, K.; Someya, T.; Kamei, K.; Niimi, M.; Uehara, Y. 2005. ***Trichosporon* species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan**. Applied and Environmental Microbiology. 71 (11): 7626- 7629.

Stamatakis, A. 2014. **RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies**. Bioinformatics. 30:1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>

Tamura. K. 2013. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0**. Mol Biol Evol. 30(12): 2725–2729.

Taylor, E.L.S., Stoianoff, M.A.R, Ferreira, R. L. 2013. **Mycological study for a management plan of neotropical show cave (Brazil)**. Internacional Journal of Speleology. 42: 267-277.

Thomas, S., Sanya, D.R.A., Fouchard, F., Nguyen, H., Kunze, G., Neuvéglise, C., Coq, A. C. 2019. ***Blastobotrys adeninivorans* and *B. raffinosifermentans*, two sibling yeast species which accumulate lipids at elevated temperatures and from diverse sugars.** Biotechnology for Biofuels. 12(154). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1492-x>

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., Taylor, J.W. 1990. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics.** Academic Press. PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual. 315-322.

Wulandari, R., Lotrakul, P., Amirta, R., Kim, S.W., Punnapayak, H., Prasongsuk, S. 2018. **First record of *Ceriporia inflata* and *Ceriporia lacerata* (*Phanerochaetaceae*, Basidiomycota) from Indonesian tropical forest.** Agriculture and Natural Resources. 52 (5): 412-418.

Vanderwolf, K. J., Malloch, D., McAlpine, D. F., Forbes, G. J. 2013. **A world review of fungi, yeast, and slime molds in caves.** International Journal of Speology. 42: 77-96.

Vicente, J., Ruiz, J., Belda, I., Benito-Vázquez, I., Marquina, D., Calderón, F., Santos, A., Benito, S. **The Genus *Metschnikowia* in Enology.** 2020. Microorganisms. 8(7): 1038. <http://doi.10.3390/microorganisms8071038>

Zhang, Z., Zhou, S., Eurwilaichitr, L., Ingsriswang, S., Raza, M., Chen, Q., Zhao, P., Liu, F., Cai, L. **Culturable mycobiota from Karst caves in China II, with descriptions of 33 new species.** 2020. Fungal Diversity. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00453-7>

APÊNDICE A- RICHNESS OF CLADOSPORIUM IN A TROPICAL BAT CAVE WITH A DESCRIPTION OF TWO NEW SPECIES

Richness of *Cladosporium* in a tropical bat cave with a description of two new species

Mayara L. S. Pereira^{1#}, João L. V. R. Carvalho^{1#}, Joenny M. S. Lima¹, Eder Barbier², Enrico Bernard²,
Jadson D. P. Bezerra³, Cristina M. Souza-Motta¹

¹ Departamento de Micologia Prof. Chaves Batista, Centro de Biociência, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50740-600. Recife, PE, Brazil

² Laboratório de Ciência Aplicada à Conservação da Biodiversidade, Departamento de Zoologia, Centro de Biociência, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50740-600. Recife, PE, Brazil

³ Setor de Micologia, Departamento de Biociências e Tecnologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Rua 235, s/n, Setor Universitário, CEP: 74605-050. Goiânia, GO, Brazil

These authors contributed equally to this work.

* Correspondence: Jadson D. P. Bezerra (jadsonbezerra@ufg.br) and Cristina M. Souza-Motta (cristina.motta@ufpe.br).

ORCID of the authors:

Mayara L. S. Pereira: 0000-0002-5250-365X

João L. V. R. Carvalho: 0000-0002-5140-8730

Joenny M. S. Lima: 0000-0002-6402-6838

Eder Barbier: 0000-0001-5068-7048

Enrico Bernard: 0000-0002-2304-1978

Jadson D. P. Bezerra: 0000-0002-7782-8602

Cristina M. Souza-Motta: 0000-0002-0964-8271

Abstract

Caves are important roosts for hundreds of bat species worldwide. Such habitats frequently harbour rich and extremely specialised biotas; however, they remain among the least-studied places on Earth, particularly in the tropical region. The fungal richness in tropical caves in Brazil has been recently studied, and these surveys have reported a largely unexplored mycobiome, highlighting some bat caves as hotspots for fungal findings. During a speleomycological survey in a bat cave in the Caatinga dry forest in Brazil, 15 fungi, previously identified as *Cladosporium*, were isolated from the air and ectoparasitic bat flies (Diptera: Streblidae) collected from the bat *Pteronotus gymnonotus* (Chiroptera: Mormoopidae). Based on morphological features and multi-gene (ITS rDNA, *ACT*, and *TEF1*) phylogenetic analyses, we reported eight *Cladosporium* species in this cave. Two new species, *C. cavernicola* and *C. pernambucoensis*, were isolated from the cave air and have been formally described here. They, along with *C. puris*, *C. subuliforme*, and *C. tenuissimum*, were related to the *C. cladosporioides* species complex. Additionally, we recorded *C. austrohemisphaericum*, *C. parahalotolerans*, and *C. sphaerospermum* (*C. sphaerospermum* species complex). Our findings emphasise the large potential for new fungal species associated with caves and bats worldwide.

Keywords: Airborne fungus, Brazilian Caatinga, *Cladosporiaceae*, Speleomycology

Introduction

Bat caves are roosts harbouring a large number of bats, commonly surpassing more than 100,000 individuals of one or more species (Otálora-Ardila et al. 2019). Consequently, they usually contain large deposits of guano, which provide specific conditions to support a rich and complex biota (Vanderwolf et al. 2013). Several factors such as water movement, air currents, plants, bat species, and human visitors can also act as exchange pathways for microorganisms between the underground and surface environments, affecting the cave habitat (Gabriel and Northup 2013). Recently, studies have indicated that several fungal species discovered from caves, bats, and guano originated from other habitats, suggesting that external vectors from an epigeal environment may play an important role in the fungal community in caves (Zhang et al. 2018).

Nearly 2,000 fungal species have been recorded in caves and similar environments (Vanderwolf et al. 2013; Cunha et al. 2020). Among them, there is the genus *Cladosporium* Link, one of the largest genera of dematiaceous hyphomycetes and is the most heterogeneous based on morphology and phylogeny (Bensch et al. 2012; Sandoval-Denis et al. 2015). More than 772 names have been included in this genus (Dugan et al. 2004) and currently comprises 857 names in the Index Fungorum (June 2021), yet several species were excluded by taxonomic treatments (Crous et al. 2006; Schubert 2005; Schubert and Braun 2004, 2005a, b; Schubert et al. 2006, 2007; Wijayawardene et al. 2020). *Cladosporium* is a monophyletic genus belonging to the family *Cladosporiaceae* (*Cladosporiales*, *Dothideomycetes*, *Ascomycota*) (Bensch et al. 2010; Abdollahzadeh et al. 2020) and *Davidiella* was previously treated as its teleomorph (Braun et al. 2003).

Cladosporium species have a unique coronate scar structure (David 1997) of its conidiogenous loci and conidial hila, consisting of a central convex dome surrounded by a raised periclinal rim (David 1997; Braun et al. 2003) and conidia in acropetal chains (Bensch et al. 2010). Species delimitation in *Cladosporium* is mainly based on molecular data and morphological features (Bensch et al. 2012, 2015). Based on the taxonomic approach, three species complexes were proposed due to the species morphological similarity: *C. herbarum* (Schubert et al. 2007), *C. sphaerospermum* (Zalar et al. 2007; Dugan et al. 2008), and *C. cladosporioides* (Bensch et al. 2010). Species in each of these complexes are morphologically similar but genetically distinguishable. Based solely on their morphology, species are mainly identified in one of the *Cladosporium* species complexes (Bensch et al. 2018).

Cladosporium species are commonly isolated from soil and air samples (indoor and external environments) and are considered mainly saprobes; however, some species have also been reported as endophytes and cause disease in humans, animals, and plants (Bensch et al. 2012, 2018). In cave environments, *Cladosporium* (along with *Aspergillus* and *Penicillium*) is the most reported airborne fungus around the world, for example, in Poland (Kokurewicz et al. 2016), Spain (Fernandez-Cortes et al. 2011), and China (Zhang et al. 2017). In a bat cave in Brazil, *Cladosporium* is one of the most frequently isolated fungi, with isolates classified as *C. sphaerospermum* and *C. cladosporioides* species complexes (Cunha et al. 2020).

Fungi found in air, guano, and on sampled bats are being studied and described as part of a study on the cave environment in Caatinga dry forests in Brazil (Cunha et al. 2020). Here, we extend our reports on the findings of such analyses, focusing on the richness of *Cladosporium* species in one of these caves, and describing two new species for the genus, based on morphological features and multi-gene (ITS rDNA, *ACT*, and *TEF1*) phylogenetic analyses.

Material and Methods

Cladosporium isolates

Cladosporium isolates were obtained from the air in the bat cave Furna do Morcego (Fig. 1) located in the Parque Nacional do Catimbau (IUCN Category II), Pernambuco state, North-eastern Brazil (8°24'00" and 8°36'35" S; 37°0'30" and 37°1'40" W), a protected area in the Caatinga domain (see Cunha et al. 2020). Airborne fungi sampling, capturing bats, and fungal isolation were performed as described by Cunha et al. (2020). In addition, two isolates were obtained from ectoparasitic bat flies (Diptera: Streblidae) found on the big naked-backed bat (*Pteronotus gymnonotus*, Chiroptera: Mormoopidae) captured in the same cave. The collection was authorised by the Ministério do Meio Ambiente (MMA)/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (SISBIO number 68992-3) and by the Ethics Committee on Animal Care–UFPE (number 114/2019).

Representative isolates and ex-type cultures are deposited in the University Recife Mycology (URM) culture collection (*Micoteca URM Profa. Maria Auxiliadora Cavalcanti*, WCDM 604) and slide preparation in the URM fungarium (*Herbário URM Pe. Camille Torrend*) at the Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil. In addition, isolates are deposited in the working collection of the Laboratório de Taxonomia e Biotecnologia Utilizando Fungos/UFPE, Recife, Brazil.

Morphology

Fungal isolates previously identified as *Cladosporium* were cultured on malt extract agar (MEA), oatmeal agar (OA), potato dextrose agar (PDA), and synthetic nutrient-deficient agar (SNA) (Crous et al. 2009). Macroscopic observation of colonies was conducted on MEA, OA, PDA, and SNA after 14 days at 25 °C in the dark. The colour of colonies was evaluated using Rayner charts (1970). Microscopic features were obtained from cultures grown on SNA after 7–14 days at 25 °C in the dark (Bensch et al. 2018). Slides were prepared in clear lactic acid as described by Bensch et al. (2012) and in lactophenol blue solution. At least 30 structures (e.g., conidiogenous cells, ramoconidia, and conidia) were measured for each new species.

DNA extraction, PCR amplification, and sequencing

For genomic DNA extraction, isolates were subcultured on PDA and incubated for 7 days at 25 °C in the dark. The Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) was used to perform DNA extraction according to the manufacturer's instructions. The primer pairs ITS4/ITS5 (White et al. 1990), ACT-512F/ACT-783R (Carbone and Kohn 1999), and EF-728F/EF-986R (Carbone and Kohn 1999) were used to amplify the first and second internal transcribed spacer regions and 5.8S intermediate rDNA of the ITS region, and the partial fragments of the actin (*ACT*) and translation elongation factor 1- α (*TEF1*) genes, respectively. The same primer pairs were used for amplicon sequencing with the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1, following the manufacturer's instructions. PCR amplification and sequencing and sequence analyses were performed as described by Bezerra et al. (2017a, b). Sequences generated in this study were deposited in the GenBank (Online Resource 1 and 2).

Phylogenetic analyses

Previously, the ITS, *ACT*, and *TEF1* sequences were used for megablast searches using the BLASTn tool of the NCBI GenBank nucleotide database. Two datasets were constructed for the phylogenetic analyses: 1) comprising sequences of the *C. cladosporioides* species complex (mainly following Iturrieta-González and Gené 2021, Zimowska et al. 2021 and Freitas et al. 2021) and 2) comprising sequences of the *C. sphaerospermum* species complex (following Bensch et al. 2018). The alignments for each locus were performed using the online MAFFT v. 7 online interface (Katoh and Standley 2013) and manual

adjustments were made using MEGA v. 7 (Kumar et al. 2016). In the *C. cladosporioides* species complex dataset, *C. sphaerospermum* (CBS 193.54) and *C. longissimum* (CBS 300.96) were used as outgroups, whereas for the *C. sphaerospermum* species complex matrix, *Cercospora beticola* (CBS 116456) was used (accession numbers are provided in Online Resource 1). Nucleotide substitution models were estimated separately for each gene region using MrModeltest 2.3 (Nylander 2004). Bayesian inference (BI) analyses (two Markov chains, 1×10^6 generations, 25% of burning and chains were sampled every 1,000 generations) were performed using MrBayes 3.2.7 (Ronquist and Huelsenbeck 2003) hosted on the CIPRES Science Gateway Portal (Miller et al. 2010). Maximum likelihood (ML) analyses were performed using RAXMLHPC2 on XSEDE 8.2.12 (Stamatakis 2014; CIPRES Science Gateway Portal) with 1,000 bootstrap and GTR+G+I as the best nucleotide substitution model. The resulting trees were viewed using the FigTree v. 1.4.4. ML bootstrap (ML-BS) $\geq 70\%$ and BI posterior probability (BPP) ≥ 0.95 values are plotted in the trees. The combined alignments were deposited in TreeBASE (study ID [\[processing\]](#)).

Results

BLASTn searches in the NCBI GenBank database showed 12 sequences of our isolates were related to *C. cladosporioides* species complex and three to *C. sphaerospermum* species complex. In the *C. cladosporioides* species complex matrix, sequences from 83 species were used, and the combined alignment contained 1,137 characters (ITS = 485, *ACT* = 268, and *TEF1* = 384), including gaps. For the *C. sphaerospermum* species complex matrix, sequences from 24 species were used, and the combined alignment contained 648 characters (*ACT* = 264 and *TEF1* = 384), including gaps. Phylogenetic trees were constructed for the combined matrices (Fig. 2 and 3) and individual datasets (data not shown). The best nucleotide for the BI analysis was SYM+I for ITS (*C. cladosporioides* species complex) and GTR+I+G for *ACT* and *TEF1* (*C. cladosporioides* and *C. sphaerospermum* species complexes).

The phylogenetic inference for the *C. cladosporioides* species complex (Fig. 2) showed that six isolates belonged to two known species (*C. tenuissimum* [two isolates] and *C. subuliforme* [four]) and the other six isolates as independent lineages in the combined tree. The isolate X24 had *C. magnoliigena* as a sister species (ML-BS = 100 and BPP = 1), whereas isolates X34, X7, and X13 nested in a clade related to *C. anthropophilum* and *C. puris*, and isolate X4, as a single lineage, related to *C. crousii*, *C. endoviticola*, and *C. pseudocladosporioides*. Two of the four unknown phylogenetic species are new and described below. We were not able to obtain new cultures during the subculturing process of isolates X13, X15, and

X24. The phylogenetic inference for the *C. sphaerospermum* species complex (Fig. 3) placed the isolate Z23 in the same clade of *C. austrohemisphaericum* (ML-BS = 98 and BPP = 1), isolate X14 within *C. sphaerospermum* (ML-BS = 98 and BPP = 1), and isolate X36 in the *C. parahalotolerans* clade.

Taxonomy

Cladosporium austrohemisphaericum Bensch, Crous & U. Braun, Stud. Mycol. 82: 42. 2015.

Type: **New Zealand**, Auckland, Morrin Reserve, isolated from black mould on the surface of the fruit of *Lagunaria patersonia* (*Malvaceae*), 18 April 2005, C.F. Hill, Hill 1163 (CBS H-22350, holotype; ex-type culture CBS 140482 = CPC 12068).

Description and illustration: Bensch et al. (2015).

Material examined: **Brazil**, Pernambuco state, Ibimirim municipality, Catimbau National Park, Furna do Morcego bat cave, isolated from the air, October 2019, M.L.S. Pereira (isolate Z23).

Notes: *Cladosporium austrohemisphaericum* (*C. sphaerospermum* species complex) was described by Bensch et al. (2015) with an ex-type culture isolated from a black mould on the surface of the fruit of *Lagunaria patersonia* (*Malvaceae*) in New Zealand. This species was also reported from *Musa* sp. (*Musaceae*) in Australia and *Cussonia thyrsiflora* (*Araliaceae*) in South Africa (Bensch et al. 2015). Based on DNA sequence analyses (Fig. 3), we identified the isolate Z23 as *C. austrohemisphaericum*. This is the first report of this species in Brazil and a tropical cave.

Cladosporium cavernicola M.L.S. Pereira, J.D.P. Bezerra & C.M. Souza-Motta, **sp. nov.** Fig. 4

MycoBank: [\[processing\]](#)

Etymology: Name reflects the location of a bat cave where the species was found.

Type: **Brazil**, Pernambuco state, Ibimirim municipality, Catimbau National Park, Furna do Morcego bat cave, isolated from the air, October 2019, M.L.S. Pereira (holotype URM [\[processing\]](#), culture ex-type URM 8389 = isolate X4).

Description: *Mycelium* aerial, abundant, occasionally immersed; hyphae branched, septate, smooth, or sometimes verruculose, subhyaline to pale olivaceous-brown, (0.5–)2–3(–4) μm wide. *Conidiophores* commonly macronematous, mononematous, occasionally micronematous, solitary, arising apically and laterally from hyphae, erect, straight, cylindrical-oblong, non-nodulose, usually geniculate-sinuous, septate, pale to dark brown, occasionally minutely verruculose at the base, 13–470 $\times$ 2–5 μm .

Conidiogenous cells integrated, monoblastic or polyblastic, mostly sympodially proliferating, geniculate-sinuous. *Conidiogenous loci* protuberant, thickened, refractive or barely to distinctly darkened, conidial formation holoblastic. *Primary ramoconidia* cylindrical-oblong, pale olivaceous-brown, smooth, slightly thickened, 0–1-septate, base truncate, (1–)2–5(–6) distal hila, subdenticulate, 0.5–1.5 µm diam., slightly thickened and darkened-refractive, 12.5–28 × 5–6.5 µm. *Secondary ramoconidia* ellipsoid-ovoid to subcylindrical or cylindrical-oblong, 0-septate, smooth, (1–)2–5(–6) distal hila, subdenticulate, 0.5–1.5 µm diam., slightly thickened and darkened-refractive, (6.5–)8–13(–18) × (5–)6.5–8(–9) µm. *Conidia* solitary, commonly catenate, unbranched or branched acropetal chains, numerous. *Terminal conidia* obovoid, limoniform or ellipsoid, occasionally subglobose, apex rounded, subhyaline to brown, smooth 7.5–8.5 × 3–5.5 µm. *Intercalary conidia* ellipsoid, limoniform or subcylindrical, smooth, 0-septate, slightly attenuated towards apex and base, 1–3(–4) distal hila, subdenticulate, 0.5–1.5 µm diam, slightly thickened and darkened-refractive, 7.5–11 × 3.5–6 µm.

Culture characteristics (14 days at 28 °C in the dark): Colonies on PDA grew up to 74 mm in diam., dark green, olivaceous grey, or olivaceous black, velvety, margins green olivaceous to dark green; reverse dark green or dark olivaceous. Aerial mycelium sparse, abundantly formed, feathery, white to greyish, forming large whitish or smoke-grey patches, without exudates. Colonies on MEA grew up to 70 mm in diam., dark green, olivaceous black at margins, floccose; reverse dark green or yellowish-green, aerial mycelium sparse, diffuse to floccose, floccose-felty, without exudate. Colonies on OA grew up to 65 mm in diam., green olivaceous, margins dark green or dark olive, regular; reverse dark green, or dark olivaceous, aerial mycelium velvety, dense, flat, without exudate. Colonies on SNA grew up to 60 mm in diam., grey to olivaceous green, or dark olivaceous, velvety; reserve iron-grey or olivaceous black, or dark green, margins lighter green, feathery, radially furrowed, wrinkled and with elevated colony centre, aerial mycelium forming large whitish or smoke-grey patches, fluffy-woolly, velvety, with exudate, and sporulation profuse.

Notes: *Cladosporium cavernicola* (*C. cladosporioides* species complex) is morphologically (Table 1) and phylogenetically (Fig. 2) related to *C. endoviticola*, *C. crousii*, and *C. pseudocladosporioides*. This new *Cladosporium* species was isolated from the air of a cave, which is a roost for bat populations that reach over 37,000 individuals. At least five bat species have been recorded in this cave, although *P. gymnonotus* is the numerically dominant species (E. Bernard, unpublished data). *Cladosporium cavernicola* morphologically differs from *C. endoviticola*, which is a species introduced from a fungus isolated from

fresh asymptomatic flowers of *Vitis vinifera* in China (Manawasinghe et al. 2020), by smaller ramoconidia ($13\text{--}26 \times 2\text{--}4.6 \mu\text{m}$) and conidia ($4.5\text{--}8.5 \times 2.5\text{--}3.3 \mu\text{m}$), and colony growth rate on PDA. *Cladosporium crousii* was described from human bronchoalveolar lavage fluid in the USA (Sandoval-Denis et al. 2016) and it is differentiated from *C. cavernicola* by the size of conidiophores (up to $230 \mu\text{m} \times 2\text{--}3.5 \mu\text{m}$), ramoconidia ($19\text{--}39 \times 2\text{--}3 \mu\text{m}$, secondary $9.5\text{--}24 \times 2.5\text{--}3.5 \mu\text{m}$), and conidia (terminal $7\text{--}9 \times 2\text{--}2.5 \mu\text{m}$ and intercalary $9\text{--}10 \times 2\text{--}3 \mu\text{m}$) (Sandoval-Denis et al. 2016). In addition, *C. crousii* exhibits smaller colony growth on OA and SNA (Sandoval-Denis et al. 2016). *Cladosporium pseudocladosporioides* was described by Bensch et al. (2010) and isolated from outside air in the Netherlands, and has been reported as a common and widespread saprobic fungus (Bensch et al. 2018). *Cladosporium cavernicola* is distinct from *C. pseudocladosporioides*, with shorter conidiophores ($15\text{--}155 \times 2\text{--}4 \mu\text{m}$) 0–5-septate, and smaller ramoconidia ($19\text{--}48 \times 3\text{--}4 \mu\text{m}$, 0–2(–3)-septate; secondary $(6.5\text{--})8\text{--}23(\text{--}29) \times (2\text{--})2.5\text{--}3.5(\text{--}4) \mu\text{m}$) and conidia (terminal $3\text{--}5.5 \times (1\text{--})1.5\text{--}2.5 \mu\text{m}$ and intercalary $4.5\text{--}13(\text{--}19) \times (1.8\text{--})2\text{--}3 \mu\text{m}$) (Bensch et al. 2010, 2018).

Cladosporium parahalotolerans Bensch & Samson, Stud. Mycol. 89: 261. 2018.

Type: **Netherlands**, Gilze, swab sample in an apartment, J. Houbraken (CBS H-23255, holotype; ex-type culture CBS 139585 = DTO 161-D3).

Description and illustration: Bensch et al. (2018).

Materials examined: **Brazil**, Pernambuco state, Ibimirim municipality, Catimbau National Park, Furna do Morcego bat cave, isolated from the air, October 2019, M.L.S. Pereira (isolate X36).

Notes: Interestingly, *C. parahalotolerans* (*C. sphaerospermum* species complex) have been mostly reported in indoor air in China, Mexico, Netherlands, and the USA (Bensch et al. 2018). Recently, *C. parahalotolerans* was found in samples of traditionally prepared dry starters in India (Anupma and Tamang 2020) and as a possible fungus colonising oil painting in Italy (Gatti et al. 2021). Sequences from our isolate (X36) clustered together with sequences from *C. parahalotolerans* in our phylogenetic analysis (Fig. 3). This is the first report of *Cladosporium parahalotolerans* in Brazil and a tropical cave, expanding the distribution of this species.

Cladosporium pernambucoensis M.L.S. Pereira, J.D.P. Bezerra & C.M. Souza-Motta, **sp. nov.** Fig. 5

MycoBank: [\[processing\]](#)

Etymology: Name reflects the Brazilian state (Pernambuco), where the species was found.

Type: **Brazil**, Pernambuco state, Ibimirim municipality, Catimbau National Park, Furna do Morcego bat cave, isolated from the air, October 2019, M.L.S. Pereira (holotype URM [processing], culture ex-type URM 8390 = Isolate X7).

Description: *Mycelium* aerial, abundant, occasionally immersed, hyphae branched, septate, smooth, subhyaline to pale olivaceous-brown, 2–3 μm wide. *Conidiophores* commonly macronematous, mononematous, occasionally slightly verruculose at the base, solitary, erect, straight, cylindrical-oblong, non-nodulose, commonly geniculate-sinuous, septate, pale to dark brown, up to $850 \times 2\text{--}4 \mu\text{m}$. *Conidiogenous cells* integrated, commonly polyblastic, sympodial proliferating, and geniculate-sinuous. *Conidiogenous loci* protuberant, thickened, refractive or barely to distinctly darkened, conidial formation holoblastic. *Primary ramoconidia* cylindrical-oblong, pale olivaceous-brown, smooth, slightly thickened, 0–1-septate, base truncate, subdenticulate, sometimes slightly rough-walled, $15\text{--}42 \times 2\text{--}3 \mu\text{m}$. *Secondary ramoconidia* ellipsoid-ovoid to subcylindrical or cylindrical-oblong, 0-septate, smooth, somewhat thickened and darkened-refractive, $8\text{--}23 \times 2\text{--}5 \mu\text{m}$. *Tertiary ramoconidia*, similar to secondary ramoconidia. *Conidia* formed in long branched chains, aseptate, branching in all directions. *Terminal conidia* oblong, subhyaline to brown, smooth, $4.5\text{--}8.5 \times 3\text{--}4.0 \mu\text{m}$. *Intercalary conidia* ellipsoid, subcylindrical, smooth, 0-septate, somewhat thickened and darkened-refractive, $5.5\text{--}15 \times 2\text{--}3.5 \mu\text{m}$.

Culture characteristics (14 days at 28 °C in the dark): Colonies on PDA grew up to 60 mm in diam., dark green, or dark olivaceous, velvety, margins olivaceous to dark green, feathery, regular; reverse dark green or dark brown or black. Aerial mycelium dense, low, forming mats, growth flat, without prominent exudates. Colonies on MEA reached 64 mm diam., light brown to olivaceous green, pale olivaceous green or whitish due to aerial mycelium; reverse mild green or olivaceous dark green, margins lighter brown. Aerial mycelium abundantly formed, velvety to floccose, covering almost the whole colony, whitish, and growth flat to effuse. Colonies on OA attained 65 mm in diam., grey-olivaceous, towards margins at first greenish olivaceous, dull-green and grey-olivaceous, dark green, velvety; reverse bright yellow or yellowish green, with neon yellow pigment, margins regular. Aerial mycelium scattered to sometimes abundant, felty, yellowish, or neon yellow pigment halo around the colony. Colonies on SNA growing up to 58 mm in diam., dark brown to dark green, or olivaceous black, slightly dusty; reverse dark green or dark brown to black, margins olivaceous green, feathery, radially furrowed, diffuse; aerial mycelium sparse, velvety, growth flat.

Other materials examined: **Brazil**, Pernambuco state, Ibimirim municipality, Catimbau National Park, Furna do Morcego bat cave, isolated from the air, July 2019, M.L.S. Pereira (URM 8391 = isolate X34).

Notes: *Cladosporium pernambucoensis* (*C. cladosporioides* species complex) is morphologically (Table 1) and phylogenetically (Fig. 2) related to *C. anthropophilum* and *C. puris*. *Cladosporium anthropophilum* was described by Sandoval-Denis et al. (2016) as ‘a common saprobic fungus with a relevant clinical importance’. The new species, *C. pernambucoensis*, differs from *C. anthropophilum* by the size of conidiophores (up to $550 \times 2\text{--}5 \mu\text{m}$), type and size of ramoconidia ($20\text{--}51 \times 2\text{--}5 \mu\text{m}$, 0(–2)-septate), and the formation of short branched chains of conidia (terminal $3.5\text{--}9 \times 2\text{--}3 \mu\text{m}$, intercalary $4.5\text{--}12(19) \times 2\text{--}3(4) \mu\text{m}$) (Sandoval-Denis et al. 2016; Bensch et al. 2018). In addition, colonies of *C. pernambucoensis* produce a yellowish or neon yellow pigment around the colony growing on OA, whereas no pigment production has been reported for *C. anthropophilum* (Sandoval-Denis et al. 2016; Bensch et al. 2018). Another species, *C. puris*, which is closely related to *C. pernambucoensis*, was recently described by Freitas et al. (2021) from submerged litter in streams in Brazil. *Cladosporium puris* has shorter conidiophores ($44\text{--}225 \times 2\text{--}3 \mu\text{m}$), and smaller ramoconidia ($8\text{--}17.5 \times 2.5\text{--}4 \mu\text{m}$, secondary $5\text{--}12.5 \times 2\text{--}3.5 \mu\text{m}$) and conidia (intercalary $3.5\text{--}6 \times 2\text{--}3.5 \mu\text{m}$, terminal $2.5\text{--}4.5 \times 2\text{--}3 \mu\text{m}$) (Freitas et al. 2021). In addition, *C. puris* has a low growth rate on PDA and MEA, and no diffuse pigment was observed in the culture medium (Freitas et al. 2021).

Cladosporium puris M.L.R. Freitas & O.L. Pereira, Phytotaxa 482(3): 232. 2021.

Type: **Brazil**, Minas Gerais, Canaã, 626–642 m, $20^{\circ}44'24''$ S, $42^{\circ}37'53''$ W, on submerged litter in streams, 7 September 2017 (VIC 44468, holotype; ex-type culture COAD 2487).

Description and illustration: Freitas et al. (2021).

Material examined: **Brazil**, Pernambuco state, Ibimirim municipality, Catimbau National Park, Furna do Morcego bat cave, isolated from the air, July 2019, M.L.S. Pereira (isolate X15).

Notes: Recently, *C. puris* (*C. cladosporioides* species complex) was proposed for two isolates obtained from submerged litter in streams found in an area of the Atlantic Forest in Brazil (Freitas et al. 2021). Our phylogenetic inference (Fig. 2) identified isolate X15 as *C. puris*, which is an airborne fungus in a bat cave of the Caatinga dry forest. This record expanded the known geographic distribution of the species by approximately 1,500 km and its potential occurrence in the environment.

Cladosporium sphaerospermum Penz., *Michelia* 2 (no. 8): 473. 1882.

Type: **Italy**, Padova, on faded leaves and stems of *Citrus* sp. (*Rutaceae*), Feb. 1882, O. Penzig (not preserved). **The Netherlands**, from the nail of man, 1949, coll. and isol. R.W. Zappey (CBS H-19738, neotype; ex-neotype culture CBS 193.54 = ATCC 11289 = IMI 049637).

Description and illustration: see Zalar et al. (2007) and Bensch et al. (2012).

Materials examined: **Brazil**, Pernambuco state, Ibimirim municipality, Catimbau National Park, Furna do Morcego bat cave, isolated from the air, October 2019, M.L.S. Pereira (isolate X14).

Notes: *Cladosporium sphaerospermum* is a cosmopolitan species found in several substrates and hosts and is used to name one of the *Cladosporium* species complexes (Zalar et al. 2007; Bensch et al. 2012). In cave environments, *C. sphaerospermum* is one of the most reported *Cladosporium* species (Vanderwolf et al. 2013).

Cladosporium subuliforme Bensch, Crous & U. Braun, *Stud. Mycol.* 67: 77. 2010.

Type: **Thailand**, Chiang Mai, Sansai, Mai Jo, palm nursery, and isol. from *Chamaedorea metallica* (*Arecaceae*), 26 Dec. 2006, coll. I. Hidayat and J. Meeboon, FIH 401, Isol. P.W. Crous (CBS H-20448, holotype; ex-type culture CBS 126500 = CPC 13735).

Description and illustration: Bensch et al. (2010).

Materials examined: **Brazil**, Pernambuco state, Ibimirim municipality, Catimbau National Park, Furna do Morcego bat cave, isolated from the air, October 2019, M.L.S. Pereira (isolates X8 and X21). **Brazil**, Pernambuco state, Ibimirim municipality, Catimbau National Park, Furna do Morcego bat cave, isolated from ectoparasitic bat flies (Diptera: Streblidae) of the bat *P. gymnonotus*, October 2020, J.L.V.R. Carvalho (isolates 16X and 19X).

Notes: *Cladosporium subuliforme* (*C. cladosporioides* species complex) was proposed as a fungus isolated from *Chamaedorea metallica* (*Arecaceae*) in a palm nursery in Thailand (Bensch et al. 2010). Later, it was isolated from yellow leaf spots on pepper (*Capsicum annuum* L. (*Solanaceae*)) in Cuba (Ramos-García et al. 2016), and in Brazil, it was associated with pecan trees (*Carya illinoensis* (*Juglandaceae*)) with leaf spot (Walker et al. 2016) and fruit scab symptoms on *Passiflora edulis* (*Passifloraceae*) (Rosado et al. 2019). Our isolates were obtained from the air and ectoparasitic bat flies found of the insectivorous bat *P. gymnonotus*. Based on phylogenetic inference (Fig. 2), this is the first

report of *C. subuliforme* in a tropical cave and associated with ectoparasitic bat flies, expanding the ecological lifestyle of this species.

Cladosporium tenuissimum Cooke, Grevillea 6 (no. 40): 140. 1878.

Type: Lectotype: **USA**, South Carolina, Aiken, on leaf sheets of *Zea mays* (*Poaceae*), H.W. Ravenel, Ravenel, Fungi Amer. Exs. 160 (NY). Isolectotypes: Ravenel and Fungi Amer. Exs. 160 (e.g., K, PH 01020427). Topotype material: Roumeguère, Fungi Sel. Gall. Exs. 5295 (e.g., NY). **USA**, Louisiana, Baton Rouge, isol. from fruits of *Lagerstroemia* sp. (*Lythraceae*), 8 September 2007 P.W. Crous (CBS H-20449, epitype; ex-type culture CBS 125995 = CPC 14253).

Description and illustration: see Bensch et al. (2012).

Materials examined: **Brazil**, Pernambuco state, Ibimirim municipality, Catimbau National Park, Furna do Morcego bat cave, isolated from the air, October 2019, M.L.S. Pereira (isolates X2 and Z28).

Notes: *Cladosporium tenuissimum* (*C. cladosporioides* species complex) is a cosmopolitan species, especially common in the tropics; often found in association with plant materials, but also isolated from air, water, and food (Bensch et al. 2010, 2012). This species was isolated from the soil of a bat cave in Bali (Bensch et al. 2012) and the air in Slovakia (Vanderwolf et al. 2013). We have reported *Cladosporium* spp. in cave environments in Brazil (Taylor et al. 2013, 2014) and the most recent study in a Brazilian bat cave (Cunha et al. 2020) showed isolates phylogenetically related to *C. tenuissimum* and other species of the *C. cladosporioides* species complex. In our phylogenetic inference (Fig. 2), two isolates (X2 and Z28) were placed together with the sequences of *C. tenuissimum*.

Discussion

In the present study, the *Cladosporium* species richness was evaluated from samples collected from the air and bat flies in a bat cave of the Caatinga dry forest in North-eastern Brazil. Among the isolates, two new *Cladosporium* species (*C. pernambucoensis* and *C. cavernicola*) were introduced into the *C. cladosporioides* species complex based on morphological features and multi-gene phylogenetic analyses (ITS rDNA, *ACT*, and *TEF1*). In the DNA sequence analyses, the best results for the characterisation of the new species were obtained based on the phylogenetic analyses of the *ACT* and *TEF1* genes, while the ITS sequences were less informative in differentiating the limits among the new species of *Cladosporium* (see Zalar et al. 2007). Six other known *Cladosporium* species (*C. austrohemisphaericum*, *C. parahalotolerans*,

C. puris, *C. sphaerospermum*, *C. subuliforme*, and *C. tenuissimum*) have also been reported in our study. Studies related to airborne fungi in caves have shown that *Cladosporium* is one of the most frequently reported genera in this environment and has been commonly found in speleological research in European, tropical, and subtropical countries (Vanderwolf et al. 2013; Cunha et al. 2020). These fungi are commonly found in the air of caves because of the easy dispersion of conidia in the environment (Bensch et al. 2012; Ogórek et al. 2014; Pusz et al. 2014).

The *C. cladosporioides* species complex comprises a large group of well-established and phylogenetically defined species (Zalar et al. 2007; Bensch et al. 2010; Freitas et al. 2021). Phylogenetic analyses of our isolates revealed that the two new species (*C. pernambucoensis* and *C. cavernicola*) described belonging to that complex, along with other previously described species (*C. tenuissimum*, *C. subuliforme*, and *C. puris*). Species in this complex are characterised by the presence of unbranched or branched conidiophores, slightly cylindrical, carrying ovoid conidia to the interim and terminal ellipsoidal, smooth, or rarely showing fine ornamentation (Bensch et al. 2012).

Phylogenetic inference positioned the new species *C. pernambucoensis* in a clade related to *C. anthropophilum* and *C. puris*. *C. cavernicola* was positioned as a single lineage in the same clade encompassing *C. crousii*, *C. endoviticola*, and *C. pseudocladosporioides*. Another isolate (*Cladosporium* sp. X24) appeared as an unknown lineage closely related to *C. magnoliigena* which formed a clade with *C. cladosporioides*, along with the isolate *Cladosporium* sp. X13, which is a single lineage related to the new species *C. pernambucoensis*, *C. anthropophilum*, and *C. puris*. *Cladosporium anthropophilum* was described by Sandoval-Denis et al. (2016) from clinical samples and human surfaces in the USA; *C. pseudocladosporioides* was described from the outside air in the Netherlands (Bensch et al. 2010); *C. magnoliigena* was described by Jayasiri et al. (2019) associated with *Magnolia grandiflora* (*Magnoliaceae*) in China; and *C. puris* was described by Freitas et al. (2021) from submerged decayed leaves in Brazil.

Interestingly, *C. subuliforme* isolates were obtained from the air and ectoparasitic bat flies. Insects in the cave environment can be vectors of fungi and, along with bats, transport spores inside caves (Dickson 1975; Cunha et al. 2020). Although some studies claim that fungi are found in association with these flies (Haelewaters 2018; Santamaria 2020), to date, no study has been conducted on the transport of *Cladosporium* spores by these Diptera. The potential role of bat ectoparasites serving as fungal vectors among hosts requires attention. In fact, studies have shown wing spinturnicid mites (*Spinturnicidae*) as one

of the propagators of *Pseudogymnoascus destructans*, which causes white-nose syndrome, an emerging infectious disease in hibernating bats (Lučan et al. 2016).

Cladosporium austrohemisphaericum, *C. sphaerospermum*, and *C. parahalotolerans* related in this study belong to the *C. sphaerospermum* species complex. The *C. sphaerospermum* species complex is mainly characterised by conidiophores that are simple or frequently branched, with 0–3-septate, smooth or verruculose ramoconidia, and globose or subglobose, pigmented, smooth to verruculose terminal conidia (Zalar et al. 2007). Most of the species in the *C. sphaerospermum* complex are considered halophilic and halotolerant and are often isolated from extreme ecological environments (Bensch et al. 2012; Zalar et al. 2007); in addition, some species are also known from indoor environments (Bensch et al. 2018). The phylogeny for species delimitation in the *C. sphaerospermum* complex has been expanded with the addition of new sequences or species (Zalar et al. 2007; Bensch et al. 2018).

Studies on the mycobiota of bat caves in Brazil and other regions of the planet are still scarce (Taylor et al. 2013; Vanderwolf et al. 2013; Zhang et al. 2021; Cunha et al. 2020); yet, they have revealed a remarkable fungal diversity, which is still neglected and contribute to the estimation of local and global diversity, highlighting the importance of conserving the cave environment.

Acknowledgements

We are grateful to Diego Bento, Jocy Cruz (ICMBio/CECAV), and Jailton Fernandes (ICMBio/PARNA do Catimbau) for their logistical support, and Narjara Pimentel (UFPE) for their invaluable help during the fieldwork. Special thanks to colleagues of the Laboratório de Taxonomia e Biotecnologia Utilizando Fungos/UFPE for their help during fungal isolation.

Declarations

Funding: This research was supported by the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE – Finance code APQ-0350-2.12/19), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Finance code 001; CAPES-PRInt process number 88887.311891/2018-00), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Funding for fieldwork was also partially provided by the Anglo American. E. Barbier has a postdoctoral grant from CAPES and FACEPE (Process number 88887.353052/2019-00). C.M. Souza-Motta and E. Bernard have a fellowship from CNPq.

Conflicts of interest/Competing interests: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

Availability of data and material: DNA sequences generated during the current study are available in GenBank. Alignments were deposited in TreeBASE.

Code availability: Not applicable.

Authors' contributions: M.L.S.P. and J.L.V.R.C.: formal analysis, investigation, data curation, writing (original draft); J.M.S.L.: formal analysis, investigation, data curation; E.B., E.B., J.D.P.B., and C.M.S.M.: conceptualization, supervision, project administration, funding acquisition, writing (original draft, review, and editing).

Ethics approval: The collection was authorised by the Ministério do Meio Ambiente (MMA)/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (SISBIO number 68992-3) and by the Ethics Committee on Animal Care–UFPE (number 114/2019).

Consent to participate: Not applicable.

Consent for publication: Not applicable.

References

- Abdollahzadeh J, Groenewald JZ, Coetzee MPA, Wingfield MJ, Crous PW (2020) Evolution of lifestyles in *Capnodiales*. *Stud Mycol* 95:381–414. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.02.004>
- Anupma A, Tamang JP (2020) Diversity of filamentous fungi isolated from some amylase and alcohol-producing starters of India. *Front Microbiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00905>
- Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW (2012) The genus *Cladosporium*. *Stud Mycol* 72:1–401. <https://doi.org/10.3114/sim0003>
- Bensch K, Groenewald JZ, Braun U, Dijksterhuis J, Yáñez-Morales M, Crous PW (2015) Common but different: the expanding real of *Cladosporium*. *Stud Mycol* 82:23–74. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.001>
- Bensch K, Groenewald JZ, Dijksterhuis J, Starink-Willemse M, Andersen B, Summerell BA, Shin HD, Dugan FM, Schroers HJ, Braun U, Crous PW (2010) Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). *Stud Mycol* 67:1–94. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.67.01>

- Bensch K, Groenewald JZ, Meijer M, Dijksterhuis J, Jurjevi Z, Andersen B, Houbraken J, Crous PW, Samson RA (2018) *Cladosporium* species in indoor environments. *Stud Mycol* 89:177–301. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.03.002>
- Bezerra JDP, Oliveira RJV, Paiva LM, Silva GA, Groenewald JZ, Crous PW, Souza-Motta CM (2017a) *Bezerromycetales* and *Wiesneriomycetales* ord. nov. (class *Dothideomycetes*), with two novel genera to accommodate endophytic fungi from Brazilian cactus. *Mycol Prog* 16:297–309. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1254-0>
- Bezerra JDP, Sandoval-Denis M, Paiva LM, Silva GA, Groenewald JZ, Souza-Motta CM, Crous PW (2017b) New endophytic *Toxicocladosporium* species from cacti in Brazil, and description of *Neocladosporium* gen. nov. *IMA Fungus* 8:77–97. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.01.06>
- Braun U, Crous PW, Dugan FM, Groenewald JZ, de Hoog GS (2003) Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s.str. *Mycol Prog* 2:3–18. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0039-2>
- Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous Ascomycetes. *Mycologia* 91:553–556. <https://doi.org/10.2307/3761358>
- Crous PW, Braun U, Wingfield MJ, Wood AR, Shin HD, Summerell BA, Alfenas AC, Cumagun CJR, Groenewald JZ (2009) Phylogeny and taxonomy of obscure genera of microfungi. *Persoonia* 22:139–161. <https://doi.org/10.3767/003158509X461701>
- Crous PW, Rong IH, Wood A, Lee S, Glen S, Botha W, Slippers B, De Beer WZ, Wingfield MJ, Hawksworth DL (2006) How many species of fungi are there at the tip of Africa? *Stud Mycol* 55: 13–33. <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.13>
- Cunha AOB, Bezerra JDP, Oliveira TGL, Barbier E, Bernard E, Machado AR, Souza-Motta CM (2020) Living in the dark: Bat caves as hotspots of fungal diversity. *PLoS ONE* 15:0243494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243494>
- David JC (1997) A contribution to the systematics of *Cladosporium*: revision of the fungi previously referred to *Heterosporium*. *Mycol Papers* 172:1–157.
- Dickson GW (1975) A preliminary study of heterotrophic microorganisms as factors in substrate of troglobitic invertebrates. *NSS Bulletin* 37:89–93.
- Dugan FM, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW (2008) Morphological plasticity in *Cladosporium sphaerospermum*. *Persoonia* 21:9–18. <https://doi.org/10.3767/003158508X334389>

- Dugan FM, Schubert K, Braun U (2004) Check-list of *Cladosporium* names. *Schlechtendalia* 11:1–103.
- Fernandez-Cortes A, Cuezva S, Sanchez-Moral S, Cañaveras JC, Porca E, Jurado V, Martin-Sanchez PM, Saiz-Jimenez C (2011) Detection of human-induced environmental disturbances in a show cave. *Environ Sci Pollut Res* 18:1037–1045. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0513-5>
- Freitas MLR, Gomes AAM, Rosado AWC, Pereira OL (2021) *Cladosporium* species from submerged decayed leaves in Brazil, including a new species and new records. *Phytotaxa* 482:223–239. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.482.3.1>
- Gabriel CR, Northup DE (2013) Microbial ecology: caves as an extreme habitat. In: Cheeptham N. (ed) *Cave microbiomes: a novel resource for drug discovery*, vol 1. Springer, New York, pp 85–108 https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5206-5_5
- Gatti L, Troiano F, Vacchini V, Cappitelli F, Baloi A (2021) An in vitro evaluation of the biocidal effect of oregano and cloves volatile compounds against microorganisms colonizing an oil painting: a pioneer study. *Appl Sci* 11:78. <https://doi.org/10.3390/app11010078>
- Haelewaters D, Hiller T, Dick CW (2018) Bats, bat flies, and fungi: A case of hyperparasitism. *Trends Parasitol* 34:784–799. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.06.006>
- Iturrieta-González I, Carvalho E, Gené J (2021) Novel species of *Cladosporium* from environmental sources in Spain. *Mycosphaerella* 77:1–25. <https://dx.doi.org/10.3897/mycokeys.77.60862>
- Jayasiri SC, Hyde KD, Jones EBG, McKenzie EHC, Jeewon R, Phillips AJL, Bhat DJ, Wanasinghe DN, Liu JK, Lu YZ, Kang JC, Xu J, Karunarathna SC (2019) Diversity, morphology and molecular phylogeny of Dothideomycetes on decaying wild seed pods and fruits. *Mycosphere* 10:1–186. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/10/1/1>
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kokurewicz T, Ogórek R, Pusz W, Matkowski K (2016) Bats increase the number of cultivable airborne fungi in the “Nietoperek” bat reserve in Western Poland. *Microb Ecol* 72:36–48. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0763-3>
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

- Lučan RK, Bandouchova H, Bartonička T, Pikula J, Zahradníková Jr A, Zúkal J, Martínková N (2016) Ectoparasites may serve as vectors for the white-nose syndrome fungus. *Parasit Vectors* 9:16. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1302-2>
- Manawasingue IS, Xinghong L, Wei Z, Yueyan Z, Ximing T, Chethana KWT, Jiye Y, Brooks S, Hyde KD (2020) Morphological and phylogenetic characterisation of endophytic fungi associated with the grapevine flowers in China. *Phytotaxa* 455:95–118. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.455.2.3>
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE). pp 1–8.
- Nylander JAA (2004) MrModeltest 2.2. Computer program and documentation distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala
- Ogórek R, Lejman A., Matkowski K (2014) Influence of the external environment on airborne fungi isolated from a cave. *Pol J Environ Stud* 23:435–440.
- Otálora-Ardila A, Torres JM, Barbier E, Pimentel NT, Leal ESB, Bernard E (2019) Thermally-assisted monitoring of bat abundance in an exceptional cave in Brazil's Caatinga drylands. *Acta Chiropterologica* 21:411–423. <http://doi.org/10.3161/15081109ACC2019.21.2.016>
- Pusz W, Ogórek R, Uklńska-Pusz CM, Zagożdżon P (2014) Speleomycological research in underground Osówka complex in Sowie Mountains (Lower Silesia, Poland). *Int J Speleol* 43:27–34. <http://dx.doi.org/10.5038/1827-806X.43.1.3>
- Ramos-García B, Shagardovsky T, Sandoval-Denis M, Ortiz Y, Malosso E, Costa PMO, Guarro J, Minter DW, Sosa D, Pérez-Martínez S, Castaneda-Ruiz RF (2016) Morphology and phylogeny of *Cladosporium subuliforme* causing yellow leaf spot of pepper in Cuba. *Mycotaxon* 131:693–702. <http://doi.org/10.5248/131.693>
- Rayner RW (1970) A mycological colour chart. CMI and British Mycological Society, Kew
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Rosado AWC, Custódio FA, Pinho DB, Ferreira APS, Pereira OL (2019) *Cladosporium* species associated with disease symptoms on *Passiflora edulis* and other crops in Brazil, with descriptions of two new species. *Phytotaxa* 409:239–260. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.409.5.1>

- Sandoval-Denis M, Gené J, Sutton DA, Wiederhold NP, Cano-Lira JF, Guarro J (2016) New species of *Cladosporium* associated with human and animal infections. *Persoonia* 36:281–298. <https://doi.org/10.3767/003158516X691951>.
- Sandoval-Denis M, Guarro J, Cano-Lira JF, Sutton DA, Wiederhold NP, de Hoog GS, Abbott SP, Decock C, Sigler L, Gené J (2016) Phylogeny and taxonomic revision of Microascaceae with emphasis on synnematus fungi. *Stud Mycol* 83:193–233. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.07.002>
- Sandoval-Denis M, Sutton DA, Martin-Vicente A, Cano-Lira JF, Wjederhold N, Guarro J, Gené J (2015) *Cladosporium* species recovered from clinical samples in the Unites States. *J Clin Microbiol* 52:2990–3000. <https://doi.org/10.1128/JCM.01482-15>
- Santamaria S, Enghoff H, Reboleira AS (2020) The first *Laboulbeniales* (Ascomycota, *Laboulbeniomycetes*) from an American millipede, discovered through social media. *MycKeys* 67:45–53. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.67.51811>
- Schubert K, Braun U (2004) Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 2. *Cladosporium* species occurring on hosts of the families Bignoniaceae and Orchidaceae. *Sydowia* 49:296–317.
- Schubert K, Braun U (2004) Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 2. *Cladosporium* species occurring on hosts of the families Bignoniaceae and Orchidaceae. *Sydowia* 49:296–317.
- Schubert K, Braun U (2005a) Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 1. Species re-allocated to *Fusicladium*, *Parastenella*, *Passalora*, *Pseudocercospora* and *Stenella*. *Mycol Progress* 4:101–109. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0113-9>
- Schubert K, Braun U (2005b) Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 4. species reallocated to *Asperisporium*, *Dischloridium*, *Fusicladium*, *Passalora*, *Pseudoasperisporium* and *Stenella*. *Fungal Divers* 20:187–208.
- Schubert K, Groenewald JZ, Braun U, Dijksterhuis J, Starink M, Hill CF, Zalar P, Hoog GS, Crous PW (2007) Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Stud Mycol* 58:105–156. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.58.05>
- Schubert K, Braun U, Mułenko W (2006) Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 5. Validation and description of new species. *Schlechtendalia* 14:55–83.
- Schubert K (2005) Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 3. A revision of *Cladosporium* species described by J.J. Davis and H.C. Greene (WIS). *Mycotaxon* 92:55–76.

- Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Taylor ELS, Ferreira RL, Cardoso PG, Stoianoff MAR (2014) Cave entrance dependent spore dispersion of filamentous fungi isolated from various sediments of iron ore cave in Brazil: a colloquy on human threats while caving. *Ambient Science* 1:16–28.
- Taylor ELS, Resende-Stoianoff MAA, Lopes FR (2013) Mycological study for a management plan of a neotropical show cave (Brazil). *Int J Speleol* 42:267–277. <https://dx.doi.org/10.5038/1827-806X.42.3.10>
- Vanderwolf KJ, Malloch D, McAlpine DF, Forbes GJ (2013) A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. *Int J Speleol* 42:77–96. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.42.1.9>
- Walker C, Muniz MFB, Rolim JM, Martins RRO, Rosenthal VC, Maciel CG, Mezzomo R, Reiniger LRS (2016) Morphological and molecular characterization of *Cladosporium cladosporioides* species complex causing pecan tree leaf spot. *Genet Mol Res* 15:gmr8714. <http://doi.org/10.4238/gmr.15038714>
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor L (1990) Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press, Cambridge, pp 315–322
- Wijayawardene NN, Hyde KD, Al-Ani LKT et al (2020) Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere* 11:1060–1456. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/8>
- Zalar P, de Hoog GS, Schroers KJ, Crous PW, Groenewald JZ, Gunde-Cimerman N (2007) Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Stud Mycol* 58:157–183. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.58.06>
- Zhang ZF, Liu F, Zhou X, Liu XZ, Liu SJ, Cai L (2017) Culturable mycobiota from Karst caves in China, with descriptions of 20 new species. *Persoonia* 39:1–31. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.01>
- Zhang ZF, Zhao P, Cai L (2018) Origin of cave fungi. *Front Microbiol* 9:1407. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01407>
- Zhang ZF, Zhou SY, Eurwilaichitr L, Ingsriswang S, Raza M, Chen Q, Zhao P, Liu F, Cai L (2021) Culturable mycobiota from Karst caves in China II, with descriptions of 33 new species. *Fungal Divers* 106:29–136. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00453-7>

Zimowska B, Becchimanzi A, Krol ED, Furmanczy A, Bensch K, Nicoletti R (2021) New *Cladosporium* species from normal and galled Flowers of Lamiaceae. *Pathogens* 10:369. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030369>**Figure captions**

Fig. 1 Furna do Morcego bat cave at the Parque Nacional do Catimbau [Catimbau National Park], Pernambuco state, Brazil. **a** Cave entrance. **b**. Sampling point 1 showing cave floor covered with bat guano. **c** Example of Petri dish used to sample airborne fungi. Photos were taken by E. Barbier

Fig. 2 Bayesian inference tree using sequences of ITS rDNA, *ACT* and *TEF* of the *Cladosporium cladosporioides* species complex. Isolates obtained in this study are in blue. New species are in bold and blue. Type strains are in bold. ML-BS and BPP values $\geq 70\%$ and ≥ 0.95 , respectively, are included near nodes. The tree was rooted to *C. sphaerospermum* (CBS193.54) and *C. longissimum* (CBS 300.96)

Fig. 3 Bayesian inference tree using sequences of *ACT* and *TEF* of the *Cladosporium sphaerospermum* species complex. Isolates obtained in this study are in blue. Type strains are in bold. ML-BS and BPP values $\geq 70\%$ and ≥ 0.95 , respectively, are included near nodes. The tree was rooted to *Cercospora beticola* (CBS 116456)

Fig 4 *Cladosporium cavernicola* URM 8389, ex-type. **a** Colonies on PDA, MEA, OA and SNA after 14 days at 28 °C in the dark. **b–c** Conidiophore and conidia. **d** Ramoconidia and conidia. **e** Conidia chain. Scale bars = 10 μm

Fig. 5 *Cladosporium pernambucoensis* URM 8390, ex-type. **a** Colonies on PDA, MEA, OA and SNA after 14 days at 28 °C in the dark. **b** Conidiophore and conidia. **c** Branched conidia chains. **d–f** Primary, secondary and tertiary ramoconidia with intercalate and terminal conidia. **g** Ramoconidia protuberance and conidia. Scale bars = 10 μm



Fig.1

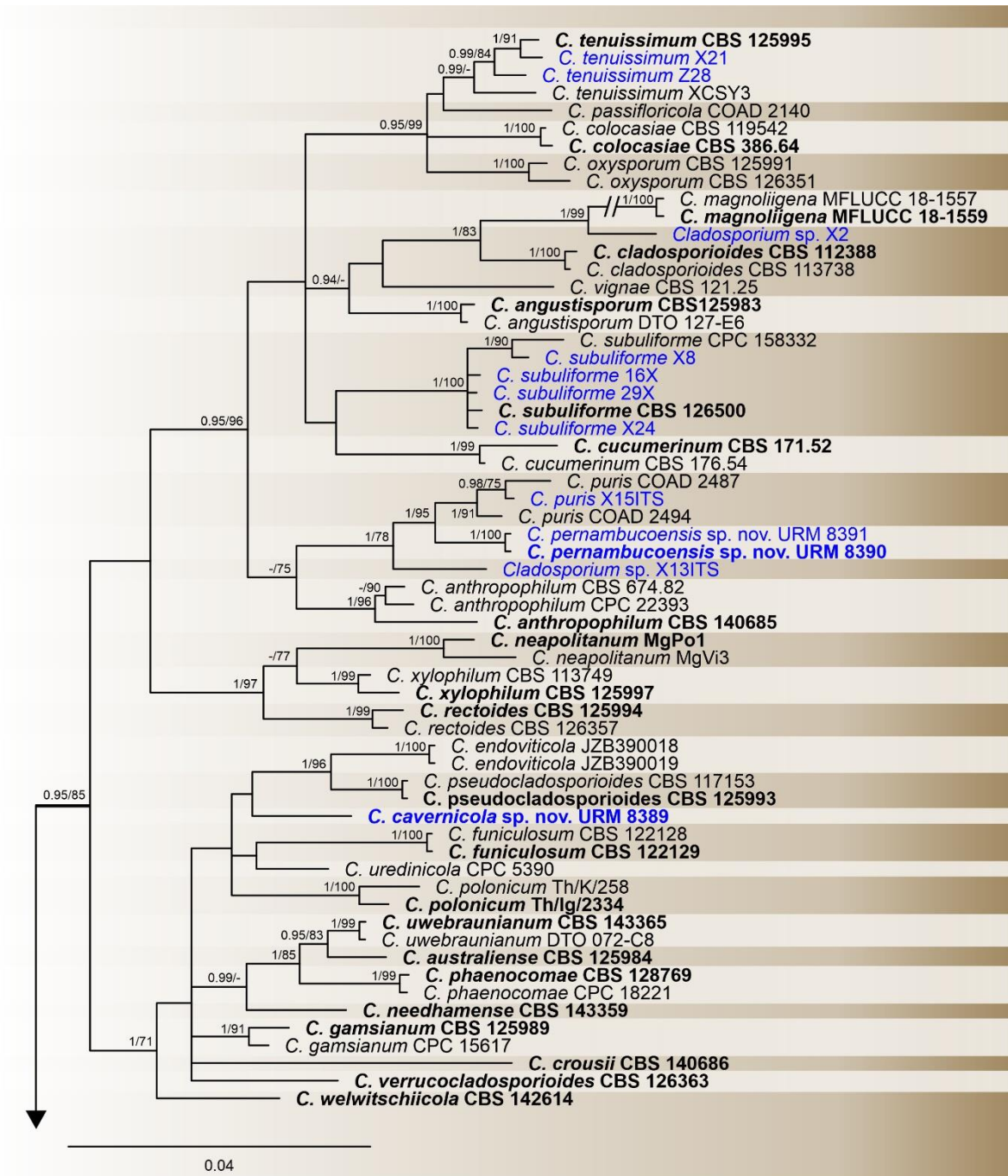


Fig. 2A

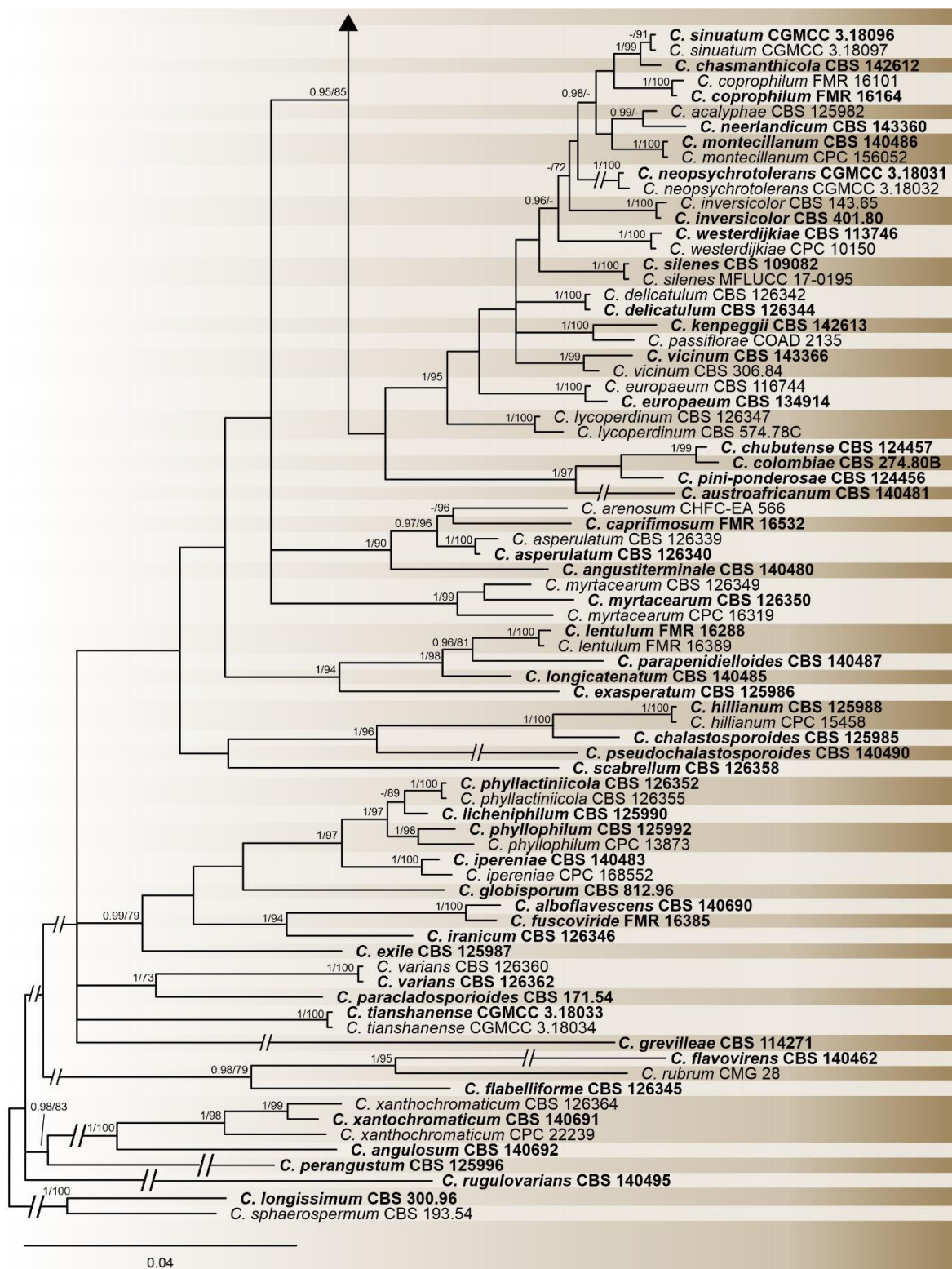


Fig.2B

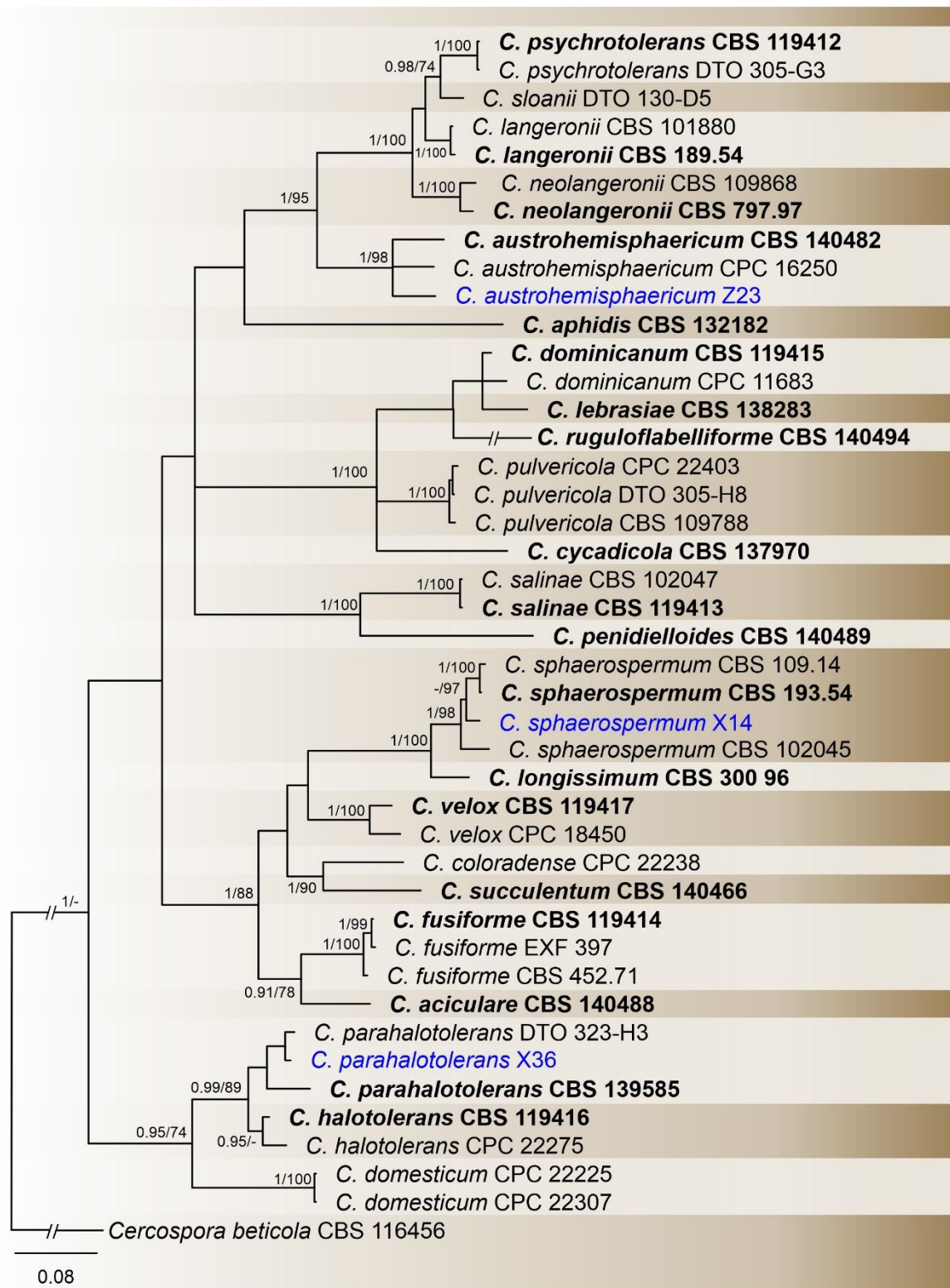


Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5

Table 1 Morphological features of *Cladosporium* species phylogenetically related to the new species *C. cavernicola* and *C. pernambucoensis*.

Species	Conidiophores in μm	Conidiogenous cells in μm	Primary ramoconidia in μm	Secondary ramoconidia in μm	Intercalary conidia in μm	Terminal conidia in μm	References
<i>Cladosporium cavernicola</i>	13–470 × 2–5	–	12.5–28 × 5–6.5	8–13 × 6.5–8	7.5–11 × 3.5–6	7.5–8.5 × 3–5.5	This study
<i>C. endoviticola</i>	–	–	13–26 × 2–4.6	–	4.5–8.5 × 2.5–3.3	–	Manawasinghe et al. (2020)
<i>C. crousii</i>	Up to 230 × 2–3.5	11–23 × 2.5–4	19–39 × 2–3	9.5–24 × 2.5–3.5	9–10 × 2–3	7–9 × 2–2.5	Sandoval-Denis et al. (2016)
<i>C. pseudocladosporioides</i>	15–155 × 2–4	9–33 × 1–2	19–48 × 3–4	8–23 × 2.5–3.5	4.5–13 × 2–3	3–5.5 × 1.5–2.5	Bensch et al. (2010)
<i>Cladosporium pernambucoensis</i>	Up to 850 × 2–4	–	15–42 × 2–3	8–23 × 2–5	5.5–15 × 2–3.5	4.5–8.5 × 3–4.0	This study
<i>C. anthropophilum</i>	Up to 550 × 2–3	15–54 × 3–5	20–42 × 2–5	7–38 × 2–5	4.5–11 × 2–3	3.5–9 × 2–3	Sandoval-Denis et al. (2016)
<i>C. puris</i>	44–225 × 2–3	7.5–42.5 × 2–3.5	8–17.5 × 2.5–4	5–12.5 × 2–3.5	3.5–6 × 2–3.5	2.5–4.5 × 2–3	Freitas et al. (2021)

Online Resource 1 List of species included in *Cladosporium cladosporioides* complex and GenBank accession numbers of sequences used in this study. Sequences in bold refer were obtained in this study.

Species	Strain/isolate	Substrate/host	GenBank nucleotide accession no. for:		
			ITS	ACT	TEF1
<i>Cladosporium acalyphae</i>	CBS 125982 ^T	<i>Acalypha australis</i>	HM147994	HM148481	HM148235
<i>C. alboflavescens</i>	CBS 140690 ^T	Animal BAL	LN834420	LN834604	LN834516
<i>C. angulosum</i>	CBS 140692 ^T	Human BAL	LN834425	LN834609	LN834521
<i>C. angustisporum</i>	CBS 125983 ^T	<i>Alloxylon wickhamii</i>	HM147995	HM148482	HM148236
	DTO-127-E6	Air in bakery	KP701935	KP702057	KP701812
<i>C. angustiterminale</i>	CBS 140480 ^T	<i>Banksia grandis</i>	KT600379	KT600575	KT600476
<i>C. anthropophilum</i>	CBS 140685 ^T	Human BAL	LN834437	LN834621	LN834533
	CBS 674.82	Seed of <i>Gossypium</i> sp.	HM148014	HM148501	HM148255
	CPC 22393	Indoor air	MF472922	MF473772	MF473349
<i>C. arenosum</i>	CHFC-EA 566	Marine sediment	MN879328	MN890008	MN890011
<i>C. asperulatum</i>	CBS 126339	Leaf litter of <i>Eucalyptus</i> sp.	HM147997	HM148484	HM148238
	CBS 126340 ^T	<i>Protea susannae</i>	HM147998	HM148485	HM148239
<i>C. australiense</i>	CBS 125984 ^T	<i>Eucalyptus moluccana</i>	HM147999	HM148486	HM148240
<i>C. austroafricanum</i>	CBS 140481 ^T	Leaf litter	KT600381	KT600577	KT600478
<i>C. caprifimosum</i>	FMR 16532 ^T (CBS 146918)	Goat dung	LR813198	LR813205	LR813210

<i>C. chalastosporoides</i>	CBS 125985 ^T	Fruiting bodies of <i>Teratosphaeria proteae-arboreae</i>	HM148001	HM148488	HM148242
<i>C. chasmanthicola</i>	CBS 142612 ^T	Leaf spots of <i>Chasmanthe aethiopica</i>	KY646221	KY646224	KY646227
<i>C. chubutense</i>	CBS 124457 ^T	<i>Pinus ponderosa</i>	FJ936158	FJ936165	FJ936161
<i>C. cladosporioides</i>	CBS 112388 ^T	Air of indoor environment	HM148003	HM148490	HM148244
<i>Cladosporium pernambucoensis</i> nov. sp.	CBS 113738	Grape bud	HM148004	HM148491	HM148245
	X34	Air of a cave	MZ518828	[processing]	[processing]
	X7	Air of a cave	MZ518830	[processing]	[processing]
<i>Cladosporium</i> sp.	X13	Air of a cave	MZ518823	[processing]	[processing]
<i>C. colocasiae</i>	CBS 386.64 ^T	<i>Colocasia esculenta</i>	HM148067	HM148555	HM148310
	CBS 119542	<i>Colocasia esculenta</i>	HM148066	HM148554	HM148309
<i>C. colombiae</i>	CBS 274.80B ^T	<i>Cortaderia</i> sp.	FJ936159	FJ936166	FJ936163
<i>C. coprophilum</i>	FMR 16101	Unidentified herbivore dung	LR813199	LR813204	LR813211
	FMR 16164 ^T (CBS 144919)	Unidentified herbivore dung	LR813201	LR813207	LR813213
<i>C. crousii</i>	CBS 140686 ^T	Human BAL	LN834431	LN834615	LN834527
<i>C. cucumerinum</i>	CBS 171.52 ^T	<i>Cucumis sativus</i>	HM148072	HM148561	HM148316

	CBS 176.54	<i>Cucumis sativus</i>	HM148078	HM148567	HM148322
<i>C. delicatulum</i>	CBS 126344 ^T	Leaves of <i>Tilia cordata</i>	HM148081	HM148570	HM148325
	CBS 126342	Indoor air	HM148079	HM148568	HM148323
<i>C. endoviticola</i>	JZB390018	Endophytic fungi associated with the grapevine flowers	MN654960	MN984220	MN984228
	JZB390019	Endophytic fungi associated with the grapevine flowers	MN654961	MN984221	MN984229
<i>C. europaeum</i>	CBS 116744	Leaves of <i>Acer pseudoplatanus</i>	HM148053	HM148540	HM148294
	CBS 134914 ^T	Indoor building material	HM148056	HM148543	HM148298
<i>C. exasperatum</i>	CBS 125986 ^T	<i>Eucalyptus tintinnans</i>	HM148090	HM148579	HM148334
<i>C. exile</i>	CBS 125987 ^T	Chasmothecia of <i>Phyllactinia guttata</i>	HM148091	HM148580	HM148335
<i>C. flavovirens</i>	CBS 140462 ^T	Human toenail	LN834440	LN834624	LN834536
<i>C. flabelliforme</i>	CBS 126345 ^T	<i>Melaleuca cajuputi</i>	HM148092	HM148581	HM148336
<i>C. funiculosum</i>	CBS 122128	<i>Ficus carica</i>	HM148093	HM148582	HM148337
<i>C. fuscoviride</i>	FMR 16385 ^T	Garden soil	LR813200	LR813206	LR813212
	CBS 122129 ^T	<i>Vigna umbellata</i>	HM148094	HM148583	HM148338
<i>Cladosporium cavernicola</i> sp. nov.	X4	Air of a cave	MZ518829	[processing]	[processing]
	FMR 16385 ^T	Garden soil	LR813200	LR813206	LR813212

	(CBS 146920)				
<i>C. gamsianum</i>	CBS 125989 ^T	<i>Strelitzia</i> sp.	HM14809 5	HM148584	HM148339
	CPC 15617	Seeds of <i>Glycine max</i>	KT600392	KT600587	KT600489
<i>C. globisporum</i>	CBS 812.96 ^T	Meat stamp	HM14809 6	HM148585	HM148340
<i>C. grevilleae</i>	CBS 114271 ^T	Leaves of <i>Grevillea</i> sp.	JF770450	JF770473	JF770472
<i>C. hillianum</i>	CPC 15458	Leaf of <i>Typha orientalis</i>	HM14809 8	HM148587	HM148342
	CBS 125988 ^T	Leaf of <i>Typha orientalis</i>	HM14809 7	HM148586	HM148341
<i>C. inversicolor</i>	CBS 401.80 ^T	Leaf of <i>Triticum aestivum</i>	HM14810 1	HM148590	HM148345
	CBS 143.65	Leaf of <i>Tilia</i> sp.	HM14810 0	HM148589	HM148344
<i>C. ipereniae</i>	CPC 168552	<i>Arctostaphylos pallida</i>	KT600395	KT600590	KT600492
	CBS 140483 ^T	<i>Puya</i> sp.	KT600394	KT600589	KT600491
<i>C. iranicum</i>	CBS 126346 ^T	Leaf of <i>Citrus sinensis</i>	HM14811 0	HM148599	HM148354
<i>C. kenpeggii</i>	CBS 142613 ^T	Leaves of <i>Passiflora edulis</i>	KY646222	KY646225	KY646228
<i>C. lentulum</i>	FMR 16288 ^T (CBS 146921)	Unidentified leaf litter	LR813203	LR813209	LR813215
	FMR 16389	Unidentified herbivore dung	LR813202	LR813208	LR813214
<i>C. licheniphilum</i>	CBS 125990 ^{ET}	<i>Phaeophyscia orbicularis</i> and <i>Physcia</i> sp.	HM14811 1	HM148600	HM148355

<i>C. longicatenatum</i>	CBS 140485 ^T	Unknown plant	KT600403	KT600598	KT600500
<i>C. longissimum</i>	CBS 300.96 ^T	Soil along coral reef coast	DQ780352	EF101385	EU570259
<i>C. lycoperdinum</i>	CBS 126347	Galls of <i>Apiosporina morbosa</i>	HM148112	HM148601	HM148356
	CBS 574.78C	<i>Aureobasidium caulivorum</i>	HM148115	HM148604	HM148359
<i>C. magnoliigena</i>	MFLUCC 18-1559 ^T	Cone of <i>Magnolia grandiflora</i>	MK347813	-	MK340864
	MFLUCC 18-1557	Cone of <i>Magnolia grandiflora</i>	MK347811	-	MK340862
<i>Cladosporium</i> sp.	X2	Air of a cave	MZ518825	[processing]	[processing]
<i>C. montecillanum</i>	CBS 140486 ^T	Pine needles	KT600406	KT600602	KT600504
	CPC 156052	<i>Taraxacum</i> sp.	KT600407	KT600603	KT600505
<i>C. myrtacearum</i>	CBS 126349	<i>Eucalyptus placita</i>	HM148116	HM148605	HM148360
	CBS 126350 ^T	<i>Corymbia foelscheana</i>	HM148117	HM148606	HM148361
	CPC 16319		KT600409	KT600605	KT600507
<i>C. neapolitanum</i>	MgPo1 ^T		MK387890	MK416051	MK416094
	MgVi3		MK387892	MK416053	MK416096
<i>C. needhamense</i>	CBS 143359 ^T	Indoor (office) air sample	MF473142	MF473991	MF473570
<i>C. neerlandicum</i>	CBS 143360 ^T	Swab sample	KP701887	KP702010	KP701764
<i>C. neopsychrotolerans</i>	CGMCC 3.18031 ^T	Soil of <i>Saussurea involucrata</i>	KX938383	KX938366	KX938400

	CGMCC 3.18032	Soil of <i>Saussurea involucrata</i>	KX938384	KX938367	KX938401
<i>C. oxysporum</i>	CBS 125991	Soil, near the terracotta army	HM148118	HM148607	HM148362
	CBS 126351	Indoor air	HM148119	HM148608	M148363
	CBS 126351	Indoor air	HM148119	HM148608	HM148363
<i>C. paracladosporioides</i>	CBS 171.54 ^T	Unknown	HM148120	HM148609	HM148364
<i>C. parapenidielloides</i>	CBS 140487 ^T	<i>Eucalyptus</i> sp.	KT600410	KT600606	KT600508
<i>C. passiflorae</i>	COAD 2135	<i>Passiflora edulis</i> , leaf	MH682175	MH729795	MH724943
<i>C. passifloricola</i>	COAD 2140	<i>Passiflora edulis</i> , fruit	-	MH729800	MH724948
<i>C. perangustum</i>	CBS 125996 ^T	<i>Cussonia</i> sp.	HM148121	HM148610	HM148365
<i>C. phaenocomae</i>	CBS 128769 ^T	<i>Phaenocoma prolifera</i>	JF499837	JF499881	JF499875
	CPC 18221	<i>Phaenocoma prolifera</i>	JF499838	JF499882	JF499876
<i>C. phyllactiniicola</i>	CBS 126352 ^T	Chasmothecia of <i>Phyllactinia guttata</i>	HM148150	HM148639	HM148394
	CBS 126355	Chasmothecia of <i>Phyllactinia guttata</i>	HM148153	HM148642	HM148397
<i>C. phyllophilum</i>	CPC 13873	<i>Teratosphaeria proteae-arboreae</i> on <i>Protea arborea</i>	HM148155	HM148644	HM148399

	CBS 125992 ^{ET}	<i>Taphrina</i> sp. on <i>Prunus</i> <i>cerasus</i>	HM148154	HM148643	HM148398
<i>C. pini-ponderosae</i>	CBS 124456 ^T	<i>Pinus ponderosa</i>	FJ936160	FJ936167	FJ936164
<i>C. polonicum</i>	Th/k/258		MK387895	MK416056	MK416099
	Th/lg/2334 ^T		MK387894	MK416055	MK416098
<i>C. pseudochalastosporoides</i>	CBS 140490 ^T	Pine needles	KT600415	KT600611	KT600513
<i>C. pseudocladosporioides</i>	CBS 125993 ^T	Outside air	HM148158	HM148647	HM148402
	CBS 117153	Leaf of <i>Paeonia</i> sp.	HM148157	HM148646	HM148401
<i>C. puris</i>	COAD 2487	Leaf litter	MK253337	MK249980	MK293777
	COAD 2494	Leaf litter	MK253338	MK249981	MK293778
	X15ITS	Air of a cave	MZ518824	-	[processing]
<i>C. rubrum</i>	CMG 28 = MUM 19.39	On flowers of <i>Vitis vinifera</i> : Beijing	MN053018	MN066639	MN066644
<i>C. rectoides</i>	CBS 125994 ^T	<i>Vitis flexuosa</i>	HM148193	HM148683	HM148438
	CBS 126357	<i>Plectranthus</i> sp.	HM148194	HM148684	HM148439
<i>C. rugulovarians</i>	CBS 140495 ^T	Leaf of unidentified <i>Poaceae</i>	KT600459	KT600656	KT600558
<i>C. scabrellum</i>	CBS 126358 ^T	<i>Ruscus hypoglossum</i>	HM148195	HM148685	HM148440
<i>C. silenae</i>	CBS 109082 ^T	<i>Silene maritima</i>	EF679354	EF679506	EF679429
	MFLUCC 17-0195	<i>Vitis vinifera</i>	MG938717	MG938682	MG938830
<i>C. sinuatum</i>	CGMCC 3.18096 ^T	Alpine soil	KX938385	KX938368	KX938402

	CGMCC 3.18097	Soil	KX938386	KX938369	KX938403
<i>C. sphaerospermum</i>	CBS 193.54	Human nails	DQ780343	EU570269	EU570261
<i>C. subuliforme</i>	CBS 126500 ^T	<i>Chamaedorea metallica</i>	HM14819 6	HM148686	HM148441
	CPC 158332	<i>Citrus</i> sp.	KT600453	KT600650	KT600552
	X24	Air of a cave	MZ51882 7	[processing]	[processing]
	X8	Air of a cave	MZ51883 1	[processing]	[processing]
	16X	Isolated from bat flies	-	[processing]	-
	29X	Isolated from bat flies	-	[processing]	[processing]
<i>C. tenuissimum</i>	CBS 125995 ^{ET}	<i>Lagerstroemia</i> sp.	HM14819 7	HM148687	HM148442
	XCSY3	<i>Coriandrum sativum</i>	MG87307 9	MT154174	MT154184
	X21	Air of a cave	MZ51882 6	[processing]	-
	Z28	Air of a cave	MZ51883 2	[processing]	[processing]
<i>C. tianshanense</i>	CGMCC 3.18033 ^T	Soil of <i>Saussurea involucrata</i>	KX938381	KX938364	KX938398
	CGMCC 3.18034	Soil of <i>Saussurea involucrata</i>	KX938382	KX938365	KX938399
<i>C. uredinicola</i>	CPC 5390	<i>Cronartium fusiforme</i> on <i>Quercus nigra</i>	AY251071	HM148712	HM148467
<i>C. uwebraunianum</i>	CBS 143365 ^T	Indoor (archive) air	MF473306	MF474156	MF473729
	DTO 072-C8	Indoor (archive) air	KP701873	KP701996	KP701750
<i>C. varians</i>	CBS 126360	<i>Ulmus</i> sp.	HM14822 2	HM148713	HM148468

	CBS 126362 ^T	<i>Catalpa bungei</i>	HM148224	HM148715	HM148470
<i>C. verrucocladosporioides</i>	CBS 126363 ^T	<i>Rhus chinensis</i>	HM148226	HM148717	HM148472
<i>C. vignae</i>	CBS 121.25	<i>Vigna unguiculata</i>	HM148227	HM148718	HM148473
<i>C. vicinum</i>	CBS 143366 ^T	Indoor air	MF473311	MF474161	MF473734
	CBS 306.84	Urediniospores of <i>Puccinia allii</i>	HM148057	HM148544	HM148299
<i>C. welwitschiicola</i>	CBS 142614 ^T	Dead leaf of <i>Welwitschia mirabilis</i>	KY646223	KY646226	KY646229
<i>C. westerdijkiae</i>	CBS 113746 ^T	Bing cherry fruits	HM148061	HM148548	HM148303
	CPC 10150	<i>Fatoua villosa</i>	HM148062	HM148549	HM148304
<i>C. xanthochromaticum</i>	CBS 140691 ^T	Human BAL	LN834415	LN834599	LN834511
	CBS 126364	<i>Erythrophleum chlorostachys</i>	HM148122	HM148611	HM148366
	CPC 22239	Indoor air	MF473316	MF474166	MF473739
<i>C. xylophilum</i>	CBS 113749	Bing cherry fruits	HM148228	HM148719	HM148474
	CBS 125997 ^T	Dead wood of <i>Picea abies</i>	HM148230	HM148721	HM148476

Online Resource 2 List of species included in *Cladosporium sphaerospermum* complex and GenBank accession numbers of sequences used in this study. Sequences in bold refer were obtained in this study.

Species	Strain/isolate	Substrate/host	GenBank nucleotide accession no. for:		
			ITS	<i>TEF1</i>	<i>ACT</i>
<i>Cladosporium aciculare</i>	CBS 140488 ^T	<i>Syzygium corynanthum</i>	KT600411	KT600509	KT600607
<i>C. aphidis</i>	CBS 132182 ^T	Unidentified aphid	JN906978	JN906984	JN906997

<i>C. austrohemisphaericum</i>	CBS 140482 ^T	<i>Lagunaria patersonia</i> , black mould on fruit surface	KT600382	KT600479	KT600578
	Z23	Air of a cave	MZ518835	[processing]	[processing]
	CPC 16250	<i>Cussonia thyrsiflora</i>	KT600383	KT600480	-
<i>C. coloradense</i>	CPC 22238	Air sample, bedroom	MF472945	MF473372	MF473795
<i>C. cycadicola</i>	CBS 137970 ^T	<i>Cycas media</i> , leaves	KJ869122	KJ869236	KJ869227
<i>C. domesticum</i>	CPC 22307	Indoor air sample	MF472955	MF473382	MF473805
	CPC 22225	Indoor air sample, air conditioner	MF472956	MF473383	MF473806
<i>C. dominicanum</i>	CPC 11683	<i>Citrus</i> sp., fruit	DQ780357	-	EF101369
	CBS 119415 ^T	Hypersaline water, salt lake	DQ780353	JN906986	KJ596641
<i>C. fusiforme</i>	CBS 119414 ^T	Hypersaline water, saltern	DQ780388	JN906988	KJ596640
	EXF 397	Hypersaline water, saltern	DQ780389	KJ596595	EF101373
	CBS 452.71	Chicken food	DQ780390	MF473412	EF101371
<i>C. halotolerans</i>	CPC 22275	Indoor air sample	MF472987	MF473415	MF473836
	CBS 119416 ^T	Hypersaline water, salterns	DQ780364	JN906989	KJ596633
<i>C. langeronii</i>	CBS 189.54 ^T	Man, mycosis	DQ780379	JN906990	EF101357
	CBS 101880	Moist aluminium school window frame	DQ780380	MF473552	EF101359
<i>C. lebrasiae</i>	CBS 138283 ^T	Milk bread	KJ596568	KJ596583	KJ596631
<i>C. longissimum</i>	CBS 300.96	Soil along coral reef coast	DQ780352	EU570259	EF101385
<i>C. neolangeronii</i>	CBS 797.97 ^T	Indoor environment	MF473143	-	MF473992
	CBS 109868	Mortar of Muro Farnesiano	DQ780377	MF473571	EF101362
<i>C. parahalotolerans</i>	DTO 323-H3	Indoor air	MF473167	MF473590	MF474015
	X36	Air of a cave	MZ518833	-	[processing]
	CBS 139585 ^T	Swab sample, apartment	KP701955	KP701832	KP702077
<i>C. penidielloides</i>	CBS 140489 ^T	<i>Acacia verticillata</i>	KT600412	KT600510	KT600608
<i>C. psychrotolerans</i>	CBS 119412 ^T	Hypersaline water	DQ780386	JN906992	KJ596632
	DTO 305-G3	House dust	MF473223	MF473645	MF474072
<i>C. pulvericola</i>	CPC 22403	Indoor air sample, living room	MF473227	MF473649	MF474076
	DTO 305-H8	House dust	MF473226	MF473648	MF474075
	CBS 109788	Indoor air, residence	MF473225	MF473647	MF474074
<i>C. ruguloflabelliforme</i>	CBS 140494 ^T	<i>Diatrapaceae</i> sp. on <i>Aloe</i> sp.	KT600458	KT600557	KT600655
<i>C. salinae</i>	CBS 119413 ^T	Hypersaline water, saltern	DQ780374	JN906993	EF101390
	CBS 102047	Hypersaline water, crystallisation pond	MF473251	MF473674	MF474101
<i>C. sloanii</i>	DTO 130-D5	Swab sample, food plant	MF473253	MF473676	MF474103

<i>C. sphaerospermum</i>	CBS 109.14	Carya illinoensis, leaf scale	DQ780350	EU570260	EF101384
	CBS 193.54	Man, nails	DQ780343	EU570261	EU570269
	X14	Air of a cave	MZ518834	[processing]	[processing]
	CBS 102045	Hypersaline water	DQ780351	EU570262	EF101378
<i>C. succulentum</i>	CBS 140466 ^T	Dolphin, bronchus	LN834434	LN834530	LN834618
<i>C. velox</i>	CPC 18450	Zea mays	KT600457	KT600556	KT600654
	CBS 119417 ^T	Bambusa sp.	DQ780361	JN906995	EF101388
<i>Cercospora beticola</i>	CBS 116456	Beta vulgaris	NR121315	AY840494	AY840458
