



**EMANUELLE BURGOS CARDOSO**

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Aspergillus*,  
*Penicillium* E *Talaromyces* IDENTIFICADAS POR  
FILOGENIA MOLECULAR E  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS MALDI-TOF**

**LAVRAS – MG  
2015**

**EMANUELLE BURGOS CARDOSO**

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Aspergillus*, *Penicillium* E *Talaromyces*  
IDENTIFICADAS POR FILOGENIA MOLECULAR E  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS MALDI-TOF**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de Mestre.

Orientador  
Dr. Ludwig H. Pfenning

Coorientador  
Dr. Lucas Magalhães de Abreu

**LAVRAS – MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA**

Cardoso, Emanuelle Burgos.

Diversidade de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e  
*Talaromyces* identificadas por filogenia molecular e  
espectrometria de massas MALDI-TOF / Emanuelle Burgos  
Cardoso. – Lavras : UFLA, 2015.

89 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)—Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. Trichocomaceae. 2. Identificação. 3. Proteômica. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 632.43

**EMANUELLE BURGOS CARDOSO**

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Aspergillus*, *Penicillium* E *Talaromyces*  
IDENTIFICADAS POR FILOGENIA MOLECULAR E  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS MALDI-TOF**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Microbiologia agrícola, para  
obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2015

Dr. Ludwig H. Pfenning, UFLA

Dr. Luís Roberto Batista, UFLA

Dr. Cledir Santos, Universidade do Minho

Orientador  
Dr. Ludwig H. Pfenning

**LAVRAS – MG  
2015**

*Aos meus avós Domingos Sebastião Burgos e Veríssima de Oliveira Reis (in  
memoriam) pelo carinho e torcida em mais uma realização  
Aos meus pais, Manoel de Oliveira Cardoso e Lícia Maria Burgos  
pelo apoio e incentivo incondicional para que eu conseguisse cumprir mais esta  
etapa.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre se fazer presente constantemente em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, e à FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Ludwig H. Pfenning, por ter me confiado este projeto, pela orientação e disponibilidade.

Ao Dr. Lucas Magalhães de Abreu, pela coorientação, disponibilidade e pelas contribuições na execução deste trabalho.

Aos professores Edson Rodrigues Filho e ou Dr. Douglas Ferreira pela colaboração com as análises de MALDI-TOF.

Aos professores Luís Roberto Batista e Cledir Santos, que se dispuseram a participar da banca.

A meus pais, irmão e familiares, por todo amor, carinho, incentivo e apoio incondicional em toda a minha trajetória.

Ao Leonardo, por todo incentivo, apoio, compreensão e companheirismo.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e pela boa convivência. Agradeço especialmente a Sarah e a Gláucia pelo grande auxílio e colaboração na condução deste trabalho.

Aos funcionários (as) e alunos do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME/UFLA) e do Departamento de Fitopatologia pelo acolhimento e grande auxílio e agradável convivência.

Aos meus amigos e companheiros de caminhada: Kaliane, Rayssa, Juliana, Nathália, Diogo, Emmanuelle, Sophia, Larissa, Rafaela, Camila e Silvino por todo carinho, ótima convivência e pelos maravilhosos momentos.

## RESUMO

Este estudo foi realizado com o intuito de caracterizar e identificar 124 isolados de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*, obtidos no Brasil a partir de substratos como solo, sedimento marinho, liteira e sementes, depositados na Coleção Micológica de Lavras CML do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Os isolados foram cultivados em meio MEA e CYA a 25 °C por sete dias no escuro. Foram selecionados 98 isolados dos três gêneros para análise por MALDI-TOF. Representantes dos grupos definidos pelo dendrograma gerado através dos espectros de massa foram submetidos à análise de filogenia molecular, utilizando sequências do locus RPB2. Outros 26 isolados, que não foram analisados por MALDI-TOF, foram identificados diretamente pela filogenia com sequências de RPB2. Pela análise dos espectros de MALDI-TOF foram diferenciados 17 grupos distintos de *Aspergillus*, 16 grupos de *Penicillium* e 10 grupos de *Talaromyces*. A análise filogenética baseada em RPB2, incluindo sequências de material tipo como referência permitiu a identificação de 20, 19 e 12 espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*, respectivamente. Ambas as técnicas empregadas geraram resultados congruentes e diferenciaram um total de 51 espécies, sendo 20 de *Aspergillus*, 19 de *Penicillium* e 12 de *Talaromyces*. Os resultados obtidos neste estudo confirmaram a utilidade da técnica de MALDI-TOF em distinguir espécies dentro dos três gêneros. Assim, esta técnica serve como ferramenta para a triagem de isolados depositados em coleções micológicas, e, em conjunto com a filogenia molecular, pode ser empregada na identificação de isolados visando a validação de um banco de dados de espectros. Constatou-se a presença de grande diversidade de espécies no Brasil, sendo várias dessas ainda sem registro formal de ocorrência.

Palavras-chave: Trichocomaceae. Identificação. Filogenia molecular.  
Proteômica

## ABSTRACT

This study aimed to characterize and identify 124 strains of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* obtained in Brazil from substrates such as soil, marine sediment, litter, and seeds, which were deposited in the Coleção Micológica de Lavras - CML, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras. Isolates were grown on MEA and CYA at 25°C in the dark. A set of 98 strains from the three genera was selected for MALDI-TOF analysis. Representative strains of groups defined by the dendrogram generated through the mass spectra were submitted to analysis of molecular phylogeny using sequences of the locus RPB2. Other 26 strains, not previously analyzed by MALDI-TOF, were identified directly by phylogeny with RPB2 sequences. The analysis of MALDI-TOF spectra distinguished 17 groups in *Aspergillus*, 16 in *Penicillium* and 10 groups in *Talaromyces*. Phylogenetic analysis, including ex-type sequences as reference, allowed for the identification of 20, 19, and 12 species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces*, respectively. Both techniques employed provided congruent results, distinguishing 20 species in *Aspergillus*, 19 in *Penicillium* and 12 species in *Talaromyces*. The results confirm the utility of MALDI-TOF to distinguish species within the three genera. Thus, this technique serves as a tool for screening mycological collections and, combined with phylogeny, may be used for the identification of strains to validate spectral databases.

Keywords: Trichocomaceae. Identification. Molecular phylogeny. Proteomics.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 Introdução geral .....	9
1 INTRODUÇÃO .....	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	12
2.1 Morfologia e taxonomia de <i>Aspergillus</i> .....	12
2.2 Morfologia e taxonomia de <i>Penicillium</i> e <i>Talaromyces</i> .....	14
2.3 Padrões culturais para identificação de <i>Aspergillus Penicillium</i> e <i>Talaromyces</i> .....	17
2.4 Marcadores moleculares utilizados no reconhecimento de espécies .....	19
2.5 Estudos filogenéticos do gênero <i>Aspergillus</i> .....	20
2.6 Estudos filogenético do gênero <i>Penicillium</i> e <i>Talaromyces</i> .....	22
2.7 Métodos de identificação de fungos baseados em MALDI-TOF .....	24
REFERÊNCIAS .....	27
CAPÍTULO 2 Diversidade de espécies de <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Talaromyces</i> identificadas por filogenia e espectrometria de massas MALDI-TOF .....	31
1 INTRODUÇÃO .....	33
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
2.1 Isolados utilizados no estudo .....	35
2.2 Caracterização morfológica .....	36
2.3 Extração de DNA .....	37
2.4 PCR e sequenciamento .....	37
2.5 Edição das sequências e análises filogenéticas .....	38
2.6 Espectrometria de massas (MALDI-TOF) .....	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
3.1 Análise de MALDI-TOF em espécies de <i>Aspergillus</i> .....	41
3.2 Análise filogenética em espécies de <i>Aspergillus</i> .....	44
3.3 Análise de MALDI-TOF em espécies de <i>Penicillium</i> .....	48
3.4 Análise filogenética das espécies de <i>Penicillium</i> .....	50
3.5 Análise de MALDI-TOF em espécies de <i>Talaromyces</i> .....	544
3.6 Análise filogenética em espécies de <i>Talaromyces</i> .....	566
3.7 Caracterização morfológica .....	58
3.7.1 Caracterização morfológica em espécies de <i>Aspergillus</i> .....	58
3.7.2 Caracterização morfológica em espécies de <i>Penicillium</i> .....	631
3.7.3 Caracterização morfológica em espécies de <i>Talaromyces</i> .....	631
4 CONCLUSÃO .....	63
REFERÊNCIAS .....	664
APÊNDICE A .....	697
APÊNDICE B .....	774
APÊNDICE C .....	796

## CAPÍTULO 1

### Introdução Geral

#### 1 INTRODUÇÃO

A diversidade de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*, os quais pertencem à ordem Eurotiales, família Trichocomaceae, é bastante estudada devido aos seus impactos, que afetam a vida humana de muitas formas: como agentes infecciosos de humanos e animais, pela produção de micotoxinas e antibióticos, e por meio a produção fermentativa de alimentos, produtos químicos e farmacêuticos (Houbraken e Samson, 2011; Schoch et al., 2009).

A família Trichocomaceae foi estudada extensivamente utilizando caracteres fenotípicos. Atualmente, diferentes técnicas têm sido introduzidas para auxiliar nas decisões taxonômicas deste grupo de fungos como a análise de metabólitos secundários e análise de sequências de DNA (Houbraken e Samson, 2011; Peterson, 2012).

As investigações sobre os limites entre espécies de fungos e as concepções metodológicas para delimitá-las têm sido amplamente discutidas no meio científico. Na literatura micológica, três conceitos de espécie são predominantes: o conceito morfológico de espécies (MSC), onde o reconhecimento de espécies é baseado em caracteres morfológicos; o conceito biológico de espécie (BSC), no qual o reconhecimento de espécies baseia-se no isolamento reprodutivo, e o conceito filogenético de espécie (PSC), no qual espécies são diagnosticadas com base em uma ancestralidade comum compartilhada, baseada em sequências de DNA. O MSC tem sido o conceito pelo qual as espécies de fungos são classificadas prioritariamente, devido à fácil aplicabilidade, porém torna-se problemático devido à variabilidade dos

caracteres morfológicos. No BSC, a ausência de uma fase sexuada reconhecível em muitas espécies de fungos faz com que sua aplicação seja impraticável. Os problemas associados com a aplicação da MSC e BSC em fungos, juntamente com o surgimento da sistemática molecular teórica e experimental nas duas últimas décadas, resultaram na crescente popularidade do PSC (Rokas et al., 2007; Taylor et al., 2000).

Recentemente, a taxonomia polifásica tem sido abordada e indica um tipo de consenso taxonômico, onde diferentes estratégias morfológicas, fisiológicas e ecológicas são integradas e utilizadas para confirmar ou dar suporte às inferências filogenéticas obtidas com diferentes marcadores gênicos (Peterson, 2012; Samson e Varga, 2009).

A região gênica ITS – *Internal Transcribed Spacer* do rDNA tem sido recentemente escolhida como *barcode* oficial para diagnose de fungos, pois seus conjuntos de *primers* são acessíveis para a amplificação dos fragmentos de DNA e, desta forma é a região mais amplamente sequenciada para fungos. Mas a região ITS também apresenta limitações, pois muitas vezes não é suficientemente variável para fazer a identificação de espécies estreitamente relacionadas. Assim, deve ser utilizada com precaução (Yilmaz et al., 2014).

Recentemente a técnica de espectrometria de massas baseada na Dissociação/Ionização por Laser Auxiliada por Matriz e análise por Tempo de Voo (MALDI-TOF) representou uma abordagem fenotípica adicional para classificar os microrganismos. Esta técnica proporciona resultados precisos e reprodutíveis e que na maioria dos casos são concordantes com identificação por métodos moleculares. Assim, MALDI-TOF é uma poderosa ferramenta para ser utilizada na taxonomia polifásica (Croxatto et al., 2011).

A técnica é baseada nas análises de perfis de proteínas gerados a partir da co-cristalização da amostra microbiológica e de uma matriz polimérica, submetidas a curtos pulsos de laser no espectrômetro de massas. Essas partículas

vaporizadas conduzem a ionização das proteínas ribossomais microbianas que são aceleradas e analisadas por tempo de voo, o qual depende da massa e grau de ionização dessas partículas proteicas. Os espectros proteicos obtidos constituem um *fingerprinting* único para uma determinada espécie. Assim, os espectros de massa obtidos são utilizados para gerar agrupamentos das amostras com base em métodos de estatística multivariada, e também são armazenados em bancos de dados, o que permite futuras comparações com novas amostras e identificação de isolados (Croxatto et al., 2011; Wieser, 2012).

Neste contexto, os isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*, pertencentes à Coleção Micológica de Lavras (CML), foram submetidos à análise por MALDI-TOF. Os perfis de espectros proteicos gerados foram utilizados para classificação dos isolados em grupos, dos quais foram escolhidos representantes para a identificação por filogenia molecular. Os agrupamentos gerados por ambas as técnicas foram comparados e os espectros obtidos futuramente serão utilizados para validação de um banco de espectros.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Morfologia e taxonomia de *Aspergillus*

Micheli (1729) introduziu o nome genérico *Aspergillus*. A característica microscópica que define este gênero é o seu conidióforo semelhante a um aspergillum ou asperge, um objeto utilizado pelo clero da Igreja Católica para aspergir água benta durante uma parte da liturgia (Bennet, 2010; Gibbons e Rokas, 2013).

O gênero *Aspergillus* foi subdividido por Raper e Fennell (1965) em 18 grupos, de acordo com as características morfológicas. Como a categorização em grupos não tem qualquer status nomenclatural, Gams et al. (1985) introduziram nomes de subgêneros e seções em *Aspergillus*. Entretanto, em várias seções do gênero, muitas variações morfológicas ocorrem, resultando em esquema taxonômico pouco objetivo (Samson et al., 2006, 2014).

O ramo ereto de hifas em desenvolvimento da célula de pé denomina-se conidióforo, que amplia no seu ápice para formar uma arredondada ou elíptica vesícula. Na área fértil da vesícula são formadas as células conidiogênicas, métulas e fiálides. Quando posicionadas sobre as métulas as fiálides são denominadas bisseriadas e quando partem diretamente das vesículas caracterizam-se como unisseriadas; produzem cadeias longas de esporos mitóticos, denominados conídios ou conidiósporos (Figura 1) (Bennet, 2010).

Outras estruturas morfológicas úteis para a identificação, além dos conidióforos, incluem cleistotécio, escleródio e associadas a este, as células Hulle. O cleistotécio e o escleródio são estruturas fechadas e esféricas que podem ser abundantes em uma colônia de *Aspergillus*. O cleistotécio é característico do estágio sexual reprodutivo, e contém os ascósporos meióticos no interior do asco. O escleródio, por outro lado, não contém esporos sexuais, é composto por

massas de micélio arredondado e sua função relaciona-se a sobrevivência em condições adversas de desenvolvimento (Bennet, 2010).

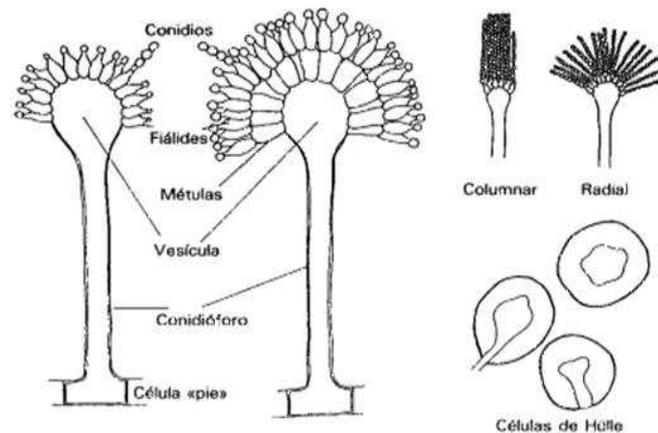


Figura 1. Morfologia do conidióforo de *Aspergillus*.

Fonte: <http://www.uprm.edu/biology/profs/betancourt/Lab/Aspergilosis.htm>

Aproximadamente um terço das espécies de *Aspergillus* também possui a forma sexuada descrita, associada a não menos que 11 gêneros: *Chaetosartorya*, *Emericella*, *Eurotium*, *Fennellia*, *Hemicarpenales*, *Neocarpenales*, *Neopetromyces*, *Neosartorya*, *Petromyces*, *Sclerocleista* e *Warcupiella*, os quais refletem diferenças não só na morfologia cleistotecial, mas também diferem amplamente em fisiologia e ecologia. Esses gêneros de estado sexual foram validamente publicados em várias ocasiões no Código Internacional de Nomenclatura Botânica. Atualmente, com a adoção do sistema único de nome para os fungos, o gênero *Aspergillus* foi atribuído para as espécies da forma sexuada e assexuada. Assim, teleomorfos como *Neosartorya*, *Emericella*, *Eurotium* e *Petromyces* são sinonimizados com *Aspergillus* (Geiser et al., 2009; Taylor et al., 2011; Pitt e Taylor, 2014; Samson et al., 2014).

Ao longo do século XX, o número de espécies nomeadas de *Aspergillus* aumentou. As espécies deste gênero foram publicadas e atualizadas

em diversos manuais e monografias, fundamentados em caracteres fenotípicos. Atualmente, com base em estudos filogenéticos envolvendo sequências dos loci calmodulina, rDNA, RPB1, RPB2, Tsr1 e Cct8, o gênero apresenta cerca de 339 espécies formalmente descritas (Peterson et al., 2008; Samson et al., 2014; Houbraken e Samson, 2011), agrupadas em quatro subgêneros e 19 seções. A classificação fenotípica de subgêneros e seções corresponde em grande parte com as atuais filogenias publicadas (Houbraken et al., 2014; Samson et al., 2014). Apesar das pesquisas de longa data, o sistema ainda está em estado de fluxo devido aos recentes estudos de filogenia molecular e quimiotaxonômicos (Samson e Varga, 2009; Samson et al., 2014).

## **2.2 Morfologia e taxonomia de *Penicillium* e *Talaromyces***

A denominação *Penicillium* é derivada de *penicillus*, que significa “pequeno pincel”. O gênero *Penicillium* é caracterizado pela produção de conídios em cadeias a partir de verticilos das fiálides. Os conídios apresentam geralmente tons de verde escuro que partem das fiálides, as quais têm pescoços retos curtos e paredes lisas. As fiálides podem se originar diretamente sobre uma estipe ou em uma, duas ou três estruturas de células de sustentação: a métula, que sustenta a fiálide e um ou dois râmulos, que conectam o conjunto fiálide-métula à estipe. Se há apenas um verticilo de fiálides o conidióforo é monoverticilado. As espécies biverticiladas apresentam geralmente dois verticilos, que podem ou não ser simétricos, as ramificações terverticiladas e quarterverticiladas incluem as espécies que têm, respectivamente, três e quatro verticilos (Figura 2) (Pitt, 2000).

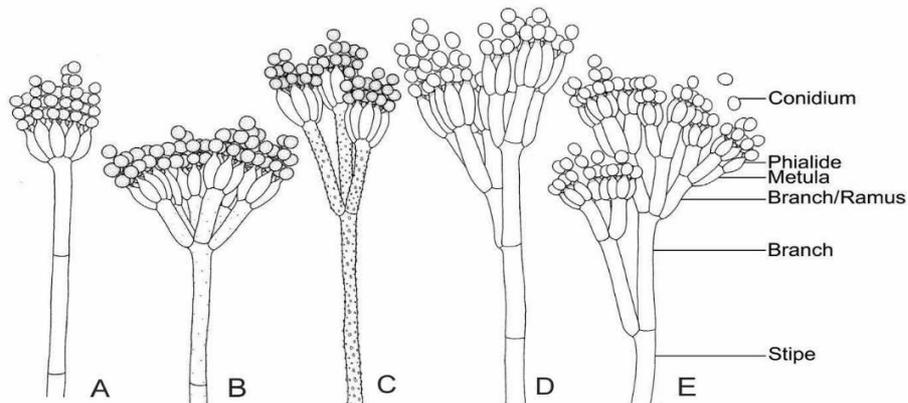


Figura 2. Morfologia dos conidióforos de *Penicillium*. A) Monoverticilado, B e C) Biverticilado, D) Terverticilado, E) Quarterverticilado  
 Fonte: Visagie et al., 2014 (Adaptado).

O conhecimento do gênero *Penicillium* foi marcado pelos estudos pioneiros de Delacroix (1891). Dierckx (1901) foi o primeiro autor a propor os subgêneros *Aspergilloides*, *Biverticillium* e *Eupenicillium*. Os autores Thom (1910), Westling (1911), Biourge (1923), Thom e Church (1926) e Zaleski (1927) foram precursores em relação à utilização de culturas axênicas para a classificação dos fungos. Muitas das técnicas utilizadas hoje podem ser traçadas até estes micologistas (Houbraken e Samson, 2011).

Uma das mais importantes contribuições para o conhecimento das espécies do gênero *Penicillium* foi a monografia “The Penicillia”, elaborada por Thom (1930). Esse autor trouxe a estabilidade necessária para a taxonomia do gênero ao classificá-lo de forma ordenada em quatro divisões (subgêneros) e subdividindo cada divisão em seções e subseções (séries) (Pitt 1979). Posteriormente, esta monografia foi revisada por Raper e Thom (1949), que não priorizaram as espécies teleomórficas, e depois por Pitt (1980), que introduziu novos nomes, designou neótipos de muitas espécies de *Penicillium* não tipificadas na revisão feita por Raper e Thom (1949), além de tratar

*Eupenicillium* separadamente de *Penicillium* e subdividir os antigos gêneros em oito séries (Houbraken e Samson, 2011).

O esquema taxonômico para anamorfos de *Penicillium* foi inicialmente baseado na forma da fiálide e ramificação dos conidióforos. Este esquema taxonômico abordou anamorfos estritos, bem como de anamorfos da fase sexual das espécies de *Penicillium*, que foi então dividido em 10 seções e 18 séries (Houbraken e Samson, 2011).

De acordo com a classificação subgenérica de Pitt (2000), as espécies monoverticiladas de *Penicilium* foram classificadas no subgênero *Aspergilloides*. As espécies biverticiladas de arranjo irregular, com as métulas suportadas terminalmente e lateralmente à estipe, foram classificadas no subgênero *Furcatum*, já as espécies biverticiladas de arranjo regular, com as métulas localizadas terminalmente à estipe, foram classificadas no subgênero *Biverticillium*. As espécies anamórficas do gênero *Talaromyces* são classificadas no subgênero *Biverticillium*.

Enquanto *Eupenicillium* é caracterizado por espécies que produzem um firme ascocarpo cleistotecial, *Talaromyces* é definido pela produção de gimnotécio macio, coberto por uma rede de hifas entrelaçadas e os ascos maduros são produzidos em cadeias (Samson et al., 2011).

A delimitação, composição de espécies e classificação taxonômica deste grupo foram modificadas em subseqüentes monografias e culminando com o reconhecimento generalizado do subgênero *Biverticillium* por meio da filogenia molecular, que atualmente abrange espécies de *Talaromyces*, espécies anamórficas de *Penicillium* biverticilados além de outras espécies estreitamente relacionadas com estes dois gêneros (Samson et al., 2011; Houbraken e Samson, 2011).

### **2.3 Padrões culturais para identificação de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces***

Em estudos taxonômicos de *Penicillium* e *Aspergillus* os isolados são analisados e cultivados sob condições laboratoriais padronizadas. Tradicionalmente, os meios de cultura empregados são: Czapek ágar (CZ) e o Extrato de malte (MEA), os quais atualmente contêm diferentes formulações (Samson et al., 2014).

Nas primeiras micrografias taxonômicas o meio Czapek-Dox era utilizado, que contém sacarose como fonte de carbono e nitrato como fonte de nitrogênio (Raper e Fennell, 1965). Posteriormente, foram introduzidos caracteres fisiológicos como o crescimento a 37 °C e a capacidade para crescer em nitrito. Pitt (1980) expandiu essas condições tanto a 5 °C e 37 °C, e a capacidade para crescer em ágar nitrato, glicerol 25 % (G25N). Este meio proporciona uma atividade de água reduzida e as espécies pertencentes ao subgênero *Biverticillium* apresentam crescimento mais restrito do que as espécies de outros subgêneros. Além disso, foi aplicado um conjunto pré-definido de mais meios de ágar e um esquema de incubação exata de 7 dias a 25 °C (Houbraken, 2013). Embora publicado há mais de 30 anos, a introdução de um regime padronizado de inoculação, incubação e a tipificação de várias espécies de *Penicillium* por Pitt (1980) ainda é considerado como a base para muitos estudos deste gênero atualmente (Houbraken e Samson, 2011).

Atualmente os meios de cultura recomendados como padrão tanto para as espécies de *Penicillium* como *Aspergillus* são Czapek levedura ágar autolisado (CYA) e de extratos de malte ágar (MEA, Oxoid ou Difco) (Visagie et al., 2014; Samson et al., 2014). Para a observação de caracteres taxonômicos adicionais, meios de cultura alternativos podem ser utilizados, incluindo Czapek ágar (CZ), CYA a 20 % de sacarose (CY20S), MEA 20 % de sacarose

(MEA20S), extrato de levedura sacarose ágar (YES), Dicloran glicerol ágar 18 % (DG18), aveia ágar (OA) e creatina sacarose ágar (CREA) (Visagie et al., 2014; Samson et al., 2014). As temperaturas padrão para incubação são de 25 °C durante 7 dias, com placas CYA adicionais a 30 e 37 °C, as quais são úteis para a distinção entre espécies (Visagie et al., 2014).

Meios de cultura como CY20S, ME20S e DG18 permitem o crescimento de *Aspergillus* xerófilos. Para *Penicillium*, DG18 e CYAS fornecem, muitas vezes, informações úteis no que diz respeito às taxas de crescimento em baixa e média atividade de água. Para ambos os gêneros, o meio YES é recomendado para estudos de perfilamento de metabólitos. As estruturas sexuais, que podem oferecer valiosas informações taxonômicas são mais facilmente produzidas em meio OA, para melhores resultados aveia orgânica e não cozida deve ser utilizada. A produção de ácido é evidenciada pela mudança na coloração roxa para amarela em meio CREA também em ambos os gêneros (Visagie et al., 2014; Samson et al., 2014).

As principais características culturais utilizadas na identificação de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* são a cor e textura da colônia, taxa de crescimento, tolerância térmica, grau de esporulação, presença de pigmentos solúveis e exsudados. A variação das estirpes é muito grande dentro da espécie e uma variedade de efeitos sutis como a fonte ágar, água ou extrato de levedura, arejamento, temperatura, umidade, luz e volume do meio despejado nas placas pode afetar a morfologia (Bennet, 2010; Visagie et al., 2014). A presença de cleistotécio ou gimnotécios ao término de uma a três semanas e a aparência dos ascósporos são os principais elementos para identificação de teleomorfos (Samson et al., 2014).

## 2.4 Marcadores moleculares utilizados no reconhecimento de espécies

A sistemática filogenética é o método usado para reconstruir os padrões que levaram à distribuição e diversidade da vida. Como uma ferramenta integrada à abordagem polifásica, a filogenia tem auxiliado a clarificar questões taxonômicas. Uma vez que o conceito morfológico de espécies é muito abrangente, o conceito filogenético de espécies tem sido extremamente utilizado para delimitar as fronteiras entre as espécies evidenciando, em vários táxons, a especiação críptica (Samson e Varga, 2009).

O DNA *barcoding* tem como a finalidade tornar a identificação das espécies de qualquer organismo eucarioto possível por meio de uma sequência de DNA padronizada e um banco de dados de referência com curadoria (Visagie et al., 2014). Atualmente a região ITS do rDNA foi aceita como *barcode* para fungos. Algumas espécies da família Trichocomaceae podem ser identificadas por este *barcode*, porém para outras espécies desta família esta região é problemática, pois a sequência de ITS frequentemente mostra pouca ou nenhuma variação entre espécies estreitamente relacionadas como no caso das espécies da seção Citrina em *Penicillium* (Houbraken et al., 2011; Peterson, 2012; Schoch et al., 2012).

Devido às limitações da região ITS, genes codificadores de proteínas como as RNA polimerases (RPB1 e RPB2),  $\beta$ -tubulina e camodulina provaram ser bons marcadores para o reconhecimento das espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* (Houbraken e Samson, 2011).

Genes de cópia como RPB1 e RPB2 são amplamente utilizados no reconhecimento das espécies de Trichocomaceae. São promissores para gerarem filogenias bem suportadas, pois contêm principalmente éxons, assim, o alinhamento desses loci é não ambíguo. Além de apresentarem elevado conteúdo de informação funcional, essas regiões gênicas também permitem uma visão

mais completa das relações evolutivas entre as espécies, pois são suficientemente conservadas e homólogas em todos os organismos. Assim parecem compartilhar uma origem evolutiva comum (Liu et al., 2004; Schmitt et al., 2009; Houbraken e Samson, 2011).

## 2.5 Estudos filogenéticos do gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* tem sido alvo de estudos taxonômicos, os quais utilizam dados de sequências de DNA. Muitos destes estudos têm foco em grupos específicos (espécies, seções e subgêneros) e o número de estudos filogenéticos a nível de gênero e acima deste são limitados (Samson et al., 2014).

O estudo de Peterson (2008) evidenciou as relações filogenéticas dentro do gênero *Aspergillus* com base nas sequências dos loci 5.8S rDNA, 28S rDNA, RPB2,  $\beta$  tubulina, calmodulina e ITS. Neste estudo, as sequências de 5.8S rDNA, 28S rDNA e RPB2 foram utilizadas para gerar uma árvore consenso com suporte de 0.95 a 1.00 de probabilidade posterior (pp), a partir do método de inferência Bayesiana. Foram evidenciados 5 subgêneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati*, *Nidulantes* e *Ornati*) e 16 seções. As espécies de *Aspergillus* estudadas por Peterson (2008) foram atribuídas a três principais clados: o primeiro clado composto pelas seções *Circumdati* e *Fumigati*, o segundo composto por membros da seção *Nidulantes* e o terceiro contendo membros do subgênero *Aspergillus*. As seções *Clavati* e *Fumigati* foram unidas no subgênero *Fumigati* e, devido à falta de apoio estatístico, a seção *Cervini* também foi provisoriamente incluída neste subgênero. Posteriormente, com os estudos de Houbraken e Samson (2011), baseados na filogenia dos genes RPB1, RPB2, Tsr1 e Cct8, a seção *Cervini* foi evidenciada como basal às seções *Clavati* e *Fumigati* e, portanto, também pertencente ao subgênero *Fumigati*.

Peterson (2008) ainda demonstra que a seção *Cremeri* pertence ao subgênero *Circumdati*. Esta conclusão é refutada nos estudos de Houbraken et al. (2011), que considera esta seção pertencente ao subgênero *Aspergillus*. Mais recentemente, Houbraken et al. (2014), com base na filogenia de 25 loci e empregando o método de máxima verossimilhança, sugerem que a seção *Cremeri* está localizada no subgênero *Nidulantes* devido ao agrupamento, com moderado valor de bootstrap (75%), da espécie *A. wentii*, a qual pertence à seção *Cremeri*, com membros da seção *Nidulantes*.

Nos estudos de Houbraken e Samson (2011) foram utilizados quatro loci, RPB1, RPB2, Tsr1 e Cct8, no método de inferência Bayesiana, que evidenciou espécies de *Aspergillus* e seus teleomorfos em um clado totalmente suportado (1.00 pp), denominado *Aspergillus sensu stricto*. Estes dados corroboram os dados de Houbraken et al. (2014) onde a filogenia de 25 loci também mostra a monofilia de *Aspergillus* e seus teleomorfos.

A relação entre os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* já tinha sido notada por Peterson (2008), que pela filogenia demonstra o monofiletismo das espécies de *Eupenicillium*, as quais estão incorporadas a um grupo monofilético maior, que inclui espécies de *Aspergillus* e relaciona este fato à estrutura ampuliforme da fiálide destes dois gêneros. Posteriormente a esse estudo, Houbraken e Samson (2011) revelaram a relação entre *Aspergillus sensu stricto* e *Penicillium sensu stricto* por meio da filogenia. Embora esses gêneros sejam morfológicamente distintos e a distinção destes seja também apoiada pela filogenia, eles anteciparam que a espécie *Penicillium inflatum* é estritamente relacionada à seção *Cremeri* do gênero *Aspergillus*, que mais tarde foi também evidenciada por Samson et al. (2014), os quais introduziram novas combinações de espécies relacionadas a *Aspergillus sensu stricto* não incluídas no estudo Houbraken e Samson (2011). Este fato prova que *Aspergillus* e *Penicillium* são grupos irmãos e que o arranjo do conidióforo do tipo *Aspergillus*, presente em

espécies de *Penicillium sensu stricto*, atribui-se a uma tendência evolutiva divergente (Houbraken e Samson, 2014; Samson et al., 2014).

A relação entre os membros do gênero *Aspergillus* nos estudos de Houbraken e Samson (2011), Peterson (2008), Peterson et al. (2008) e Samson (2008) evidenciaram que os grupos separados por meio de caracteres fenotípicos por Raper e Fennell (1965), em grande parte, correspondem com as classificações atuais. O gênero *Aspergillus* conta atualmente com 4 subgêneros e 19 seções (Samson et al., 2014).

## **2.6 Estudos filogenéticos dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces***

Historicamente, os gêneros teleomórficos *Eupenicillium* e *Talaromyces* foram associados ao gênero *Penicillium sensu lato*. Por meio dos estudos filogenéticos, as diferenças entre *Penicillium sensu stricto* e *Talaromyces* demonstravam que poderia haver um problema significativo com o conceito genérico de *Penicillium sensu lato*. Até então, *Penicillium sensu stricto* e *Talaromyces* ocorriam como clados distintos dentro Trichocomaceae, que poderiam ser considerados como subfamílias (Houbraken e Samson, 2011; Samson et al., 2011).

Vários estudos relacionados ao gênero *Penicillium* indicaram que este gênero é polifilético e a maioria das espécies poderia ser dividida em dois grandes clados (Berbee et al., 1995; Houbraken et al., 2014). Estudos que incluíram a classificação subgenérica foram realizados por Peterson (2000), que investigou a filogenia de *Eupenicillium* e membros dos subgêneros *Penicillium*, *Furcatum* e *Aspergilloides*. O autor dividiu as espécies estudadas em seis grupos, demonstrando que muitas taxa subgenéricas em *Penicillium* são polifiléticas, pois diferentes subgêneros agrupavam no mesmo mesmo clado. Os dados também indicaram que os sistemas de classificação baseados na

ramificação dos conidióforos não foram congruentes com a filogenia sendo necessário um novo sistema de classificação secundária.

Fundamentado em dados anteriormente citados, Houbraken e Samson (2011) definiram um clado como *Penicillium sensu stricto*, que inclui espécies de *Eupenicillium* e a maioria das espécies anteriormente pertencentes a *Penicillium* dos subgêneros: *Penicillium*, *Aspergilloides* e *Furcatum*, segundo a classificação de Pitt (1980). O outro clado principal está centrado em *Talaromyces*, que inclui espécies de *Talaromyces* e *Penicillium* anteriormente pertencente ao subgênero *Biverticillium*. Resumidamente, *Eupenicillium* é tratado como sinônimo de *Penicillium sensu stricto* e *Talaromyces* é agora também definido como um gênero pleomórfico, incorporando espécies anamórficas de *Penicillium* anteriormente incluídas no subgênero *Biverticillium* (Houbraken e Samson, 2011; Houbraken et al., 2014).

Baseado nas relações filogenéticas de *Penicillium sensu stricto*, Houbraken e Samson (2011) propuseram a subdivisão de *Penicillium* em dois subgêneros: *Penicillium* e *Aspergilloides*. Este último foi sinonimizado com o gênero *Furcatum* por ser mais antigo. Também foram propostas neste estudo 25 seções além da reforma de antigos nomes em diferentes níveis (subgêneros, subseções e séries) e exclusão nomes inválidos. Estas mudanças na filogenia não são congruentes com os sistemas de classificação dos subgêneros e seções, que foram baseados em parâmetros morfológicos, tais como a ramificação do conidióforo e a taxa de crescimento em meios de cultura.

Atualmente, o gênero *Talaromyces* é dividido em sete seções nomeadas como *Bacillispori*, *Helici*, *Islandici*, *Purpurei*, *Subinflati*, *Talaromyces* e *Trachyspermi* as quais foram resolvidas pela filogenia dos loci ITS, BenA e RPB2 com o método de inferência Bayesiana (Yilmaz et al., 2014). Em relação a *Eupenicillium*, a monografia que trata de suas divisões em seções data de 1983,

realizada por Stolk e Samson, onde quatro seções foram introduzidas e hoje pertencem a *Penicillium sensu stricto* (Houbraken e Samson, 2011).

A divisão de *Penicillium* em dois gêneros não só se reflete nos estudos filogenéticos, mas também na morfologia, fisiologia e produção de metabólitos. *Penicillium sensu stricto* está mais intimamente relacionado com *Aspergillus* e estes dois gêneros compartilham mais caracteres uns com os outros do que com *Talaromyces* (Houbraken et al., 2014).

## **2.7 Métodos de identificação de fungos baseados em MALDI-TOF**

A conclusão do sequenciamento dos genomas de vários organismos resultou em um novo impulso para pesquisas envolvendo proteínas. Em virtude da sua estreita relação com os dados produzidos pelas pesquisas genômicas, a nova fase conhecida como pós-genômica tem-se caracterizado pelo domínio de um novo método analítico empregado no estudo de proteínas: a espectrometria de massas - *mass spectrometry*. Na década de 1980, o desenvolvimento do MALDI-TOF permitiu a análise de biomarcadores relativamente grandes (Bizzini e Greub, 2010). Embora a maioria das aplicações de MALDI-TOF tenham sido focadas em bactérias, um número cada vez maior de estudos utiliza essa técnica para caracterizar fungos (Giebel et al., 2010).

MALDI-TOF MS é uma técnica físico-química robusta para a análise de moléculas orgânicas. Nesta técnica, as amostras são misturadas a uma matriz, geralmente de ácido orgânico com forte absorção óptica. Essa mistura resulta na cristalização da amostra e do composto. Após esta co-cristalização, já no espectrômetro de massas, breves pulsos de laser são bombardeados e vaporiza o microrganismo e a matriz, conduzindo a dissociação e ionização das proteínas ribossomais, que passam a estar na fase gasosa. Um campo eletroestático acelera os íons antes de entrar no tubo de voo que possui um detector na sua

extremidade. O tempo de voo, *Time of flight* (TOF), dos analitos para alcançar o detector depende da sua massa ( $m$ ) e de carga ( $z$ ). Assim, baseado neste tempo de voo, um espectro característico é gravado e constitui um *fingerprint* específico da amostra, que é única para uma dada espécie (Croxatto et al., 2011; Wieser et al., 2012).

Quando aplicada à identificação microbiana, a técnica de MALDI-TOF baseia-se na análise de biomarcadores celulares específicos, especificamente nas proteínas ribossomais dos microrganismos. No caso dos fungos filamentosos, além destas proteínas, as proteínas constituintes das paredes do micélio e/ou esporos também são de grande relevância neste processo de identificação (Santos e Lima, 2010).

Um dos primeiros estudos que empregou a técnica de MALDI-TOF para caracterização de fungos foi realizado por Welham et al. (2000). Espécies de *Penicillium*, bem como *Scytalidium dimidiatum* e *Trichophyton rubrum* foram caracterizadas nesse estudo. Li et al. (2000) também utilizaram MALDI-TOF para investigar os esporos intactos de espécies aflatoxigênicas e não aflatoxigênicas de *Aspergillus*.

Alanio et al. (2010) utilizaram a técnica de MALDI-TOF para identificar espécies de *Aspergillus* e validar o banco de dados, que incluía espectros de espécies deste gênero comumente responsáveis por infecções em humanos. Os isolados utilizados para comparação com o banco de dados foram de amostras hospitalares, previamente identificadas pela morfologia e por sequências parciais de  $\beta$ -tubulina e calmodulina. Os resultados deste estudo mostraram que 98,6 % dos isolados foram corretamente identificados por MALDI-TOF, sendo apenas dois identificados somente pelas sequências dos loci anteriormente citados.

Abreu et al. (2014) validaram 45 isolados de *Clonostachys* de diferentes substratos e localidades brasileiras, demonstrando congruência na comparação dos resultados de filogenia molecular, baseada em sequências de  $\beta$ -tubulina e

ITS-LSU rDNA, com a classificação fenotípica dos isolados obtidos a partir da técnica de MALDI-TOF. Hettick et al. (2011) também aplicaram a técnica de MALDI-TOF em 76 isolados de 35 gêneros incluindo *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* e os resultados deste estudo indicaram que os dados resultantes desta técnica identificaram cada espécie e/ou estirpe com 98,5-100 % de precisão, mostrando que esta metodologia pode ser utilizada para identificação complementar de fungos.

Duas abordagens gerais para a identificação de microrganismos por MALDI-TOF têm sido propostas. Na primeira abordagem, os espectros obtidos são comparados a um banco de dados previamente montados, que são, em alguns, casos comercialmente disponíveis. A segunda abordagem possibilita a construção ou ampliação do banco de dados, uma vez que os espectros associados a um microrganismo desconhecido requerem a identificação prévia por outros métodos, como o filogenético. Assim, dentre as grandes vantagens da utilização de MALDI-TOF são que sua utilização permite uma simples, confiável e, principalmente, uma rápida identificação de espécies, inclusive delimitação de linhagens (De Respini et al., 2010; Marinach-Patrice et al., 2009; Giebel et al., 2010).

## REFERÊNCIAS

Abreu LM, Moreira GM, Ferreira D, Rodrigues-Filho E, Pfenning LH (2014) Diversity of *Clonostachys* species assessed by molecular phylogenetics and MALDI-TOF mass spectrometry. *Fung Biol* 118: 1004-1012.

Alanio A, Beretti JL, Dauphin B, Mellado E (2011) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect* 17: 750–755.

Benjamin CR (1955) Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologia* 47: 669-687.

Bennet JW (2010) An overview of the genus *Aspergillus*. Disponível em: <<http://open-access-biology.com/aspergillus/aspergilluschl.pdf>> Acesso em: 22 nov. 2014

Berbee ML, Yoshimura A, Sugiyama J, Taylor JW (1995) Is *Penicillium* monophyletic – an evaluation of phylogeny in the family *Trichocomaceae* from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA-sequence data. *Mycologia* 87: 210–222.

Bizzini A, Greub G (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect* 16: 1614–1619.

Croxatto A, Prod'hom G, Greub G (2012) Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *Microbiol Rev* 36: 380–407.

De Respinis S, Vogel G, Benagli C, Tonolla M, Petrini O, Samuels GJ (2010) MALDI-TOF MS of Trichoderma: a model system for the identification of microfungi. *Mycol Progr* 9: 79-100.

Gams W, Christensen M, Onions AH, et al. (1985) Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Samson RA & Pitt JI (eds.) *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. New York: Plenum Press. p. 55–62.

Geiser DM (2009) Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Med Mycol* 47: S21–S26.

Gibbons JG, Rokas A (2013) The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends in Microbiol* 21: 14-22.

Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, et al. (2010) Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol* 71: 149–184.

Hettick JM, Green BJ, Buskirk AD, Slaven J, et al. (2011) Discrimination of Fungi by MALDI-TOF Mass Spectrometry. In: Fenselau C, et al. *Rapid Characterization of Microorganisms by Mass Spectrometry*. Chap. 3. Washington, D.C. ACS Symposium Series American Chemical Society.

Houbraken J, Samson RA (2011) Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud Mycol* 1: 1-51.

Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA (2011) Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*. *Stud Mycol* 70: 53–138.

Houbraken J, Vries de RP, Samson RA (2014) Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Adv Appl Microbiol* 86: 199–249.

Liu Y, Hall BD (2004) Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 101: 4507–4512.

Marinach-Patrice C, Lethuillier A, Marly A, Brossas JY, et al. (2009) Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin Microbiol Infect* 15: 634-642.

Peterson SW (2000) Phylogenetic analysis of *Penicillium* species based on ITS and LSU-rDNA nucleotide sequences classification. In: Samson RA, Pitt, JI (eds.) *Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus**. New York: Plenum Press. p. 163–178.

Peterson SW (2008) Phylogenetic analyses of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100: 205–226.

Peterson SW (2012) *Aspergillus* and *Penicillium* identification using DNA sequences: barcode or MLST? *Appl Microbiol Biotechnol* 95: 339–344.

Peterson SW, Varga J, Frisvad JC, Samson RA (2008). Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*. In Varga J, Samson RA (eds.) *Aspergillus* in the genomic era. Wageningen Academic Publishers. p. 33–56.

Pitt JI (1980) The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: Academic Press.

Pitt JI, Taylor JW (2014) *Aspergillus*, its sexual states and the new International Code of Nomenclature. *Mycologia* 106: 1051–1062.

Pitt JI (2000) A laboratory guide to common *Penicillium* species. CSIRO North Ryde, NSW, Australia.

Rokas A, Payne G, Fedorova ND, Baker SE, et al. (2007) What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*? *Stud Mycol* 59: 11-17.

Samson RA, Hong SB, Frisvad JC (2006) Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Med Mycol* 44: S133-S148.

Samson RA, Varga J, Witiak SM, Geiser DM (2007) The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. *Stud Mycol* 59: 71–73.

Samson RA, Varga J (2009) What is a species in *Aspergillus*? *Med Mycol* 47: S13-S20.

Samson RA, Yilmaz N, Houbraken J, Spierenburg H, et al. (2011) Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Stud Mycol* 70: 159–183.

Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, et al. (2014) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 78: 141–173.

Schmitt I, Crespo A, Divakar PK, Fankhauser JD, et al. (2009) New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. *Persoonia* 23: 35-40.

Schoch CL, Sung GH, Giraldez FL, Townsend J, et al. (2009) The Ascomycota Tree of Life: a Phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Syst Biol* 58: 224–239.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, et al. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 109: 6241–6246.

Stolk AC, Samson RA (1983) The ascomycete genus *Eupenicillium* and related *Penicillium* anamorphs. *Stud Mycol* 23: 1-149.

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, et al. (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fung Gen Biol* 31: 21–32.

Taylor JW (2011) One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* 2: 113.

Welham KJ, Domin MA, Johnson K, Jones LE, Ashton DS (2000) Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Comm Mass Spectrom* 14: 307–310.

Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S (2012) MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 965–974.

Yilmaz N, Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA (2014) Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Stud Mycol* 78: 175–341.

Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, et al. (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol* 78: 343–371.

## CAPÍTULO 2

### **Diversidade de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* identificadas por filogenia e espectrometria de massas MALDI- TOF**

#### **RESUMO**

Este estudo foi realizado com o intuito de caracterizar e identificar 124 isolados de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*, obtidos no Brasil a partir de substratos como solo, sedimento marinho, liteira e sementes, depositados na Coleção Micológica de Lavras CML do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Os isolados foram cultivados em meio MEA e CYA a 25 °C por sete dias no escuro. Foram selecionados 98 isolados dos três gêneros para análise por MALDI-TOF. Representantes dos grupos definidos pelo dendrograma gerado através dos espectros de massa foram submetidos à análise de filogenia molecular, utilizando sequências do locus RPB2. Outros 26 isolados, que não foram analisados por MALDI-TOF, foram identificados diretamente pela filogenia com sequências de RPB2. Pela análise dos espectros de MALDI-TOF foram diferenciados 17 grupos distintos de *Aspergillus*, 16 grupos de *Penicillium* e 10 grupos de *Talaromyces*. A análise filogenética baseada em RPB2, incluindo sequências de material tipo como referência permitiu a identificação de 20, 19 e 12 espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*, respectivamente. Ambas as técnicas empregadas geraram resultados congruentes e diferenciaram um total de 51 espécies, sendo 20 de *Aspergillus*, 19 de *Penicillium* e 12 de *Talaromyces*. Os resultados obtidos neste estudo confirmaram a utilidade da técnica de MALDI-TOF em distinguir espécies dentro dos três gêneros. Assim, esta técnica serve como ferramenta para a triagem de isolados depositados em coleções micológicas, e, em conjunto com a filogenia molecular, pode ser empregada na identificação de isolados visando a validação de um banco de dados de espectros. Constatou-se a presença de grande diversidade de espécies no Brasil, sendo várias dessas ainda sem registro formal de ocorrência.

Palavras-chave: Trichocomaceae. Identificação. Filogenia molecular. Proteômica

## ABSTRACT

This study aimed to characterize and identify 124 strains of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* obtained in Brazil from substrates such as soil, marine sediment, litter, and seeds, which were deposited in the Coleção Micológica de Lavras - CML, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras. Isolates were grown on MEA and CYA at 25°C in the dark. A set of 98 strains from the three genera was selected for MALDI-TOF analysis. Representative strains of groups defined by the dendrogram generated through the mass spectra were submitted to analysis of molecular phylogeny using sequences of the locus RPB2. Other 26 strains, not previously analyzed by MALDI-TOF, were identified directly by phylogeny with RPB2 sequences. The analysis of MALDI-TOF spectra distinguished 17 groups in *Aspergillus*, 16 in *Penicillium* and 10 groups in *Talaromyces*. Phylogenetic analysis, including ex-type sequences as reference, allowed for the identification of 20, 19, and 12 species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces*, respectively. Both techniques employed provided congruent results, distinguishing 20 species in *Aspergillus*, 19 in *Penicillium* and 12 species in *Talaromyces*. The results confirm the utility of MALDI-TOF to distinguish species within the three genera. Thus, this technique serves as a tool for screening mycological collections and, combined with phylogeny, may be used for the identification of strains to validate spectral databases.

Keywords: Trichocomaceae. Identification. Molecular phylogeny. Proteomics.

## 1 INTRODUÇÃO

Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* pertencem à ordem Eurotiales, família Trichocomaceae, com ocorrência predominante no solo. As espécies destes três gêneros representam fungos com alta complexidade fisiológica, que são capazes de crescer em ambientes com baixa atividade de água, bem como suportar elevadas temperaturas. Muitas espécies produzem metabólitos secundários bioativos como micotoxinas, antibióticos, ácidos orgânicos e enzimas com aplicação industrial (Bennet, 2010; Samson et al., 2014).

A importância e diversidade destes gêneros destaca a necessidade de uma identificação precisa das espécies. Para tanto, é essencial que uma identificação apurada se torne rotina (Pitt, 2000). As ferramentas atuais para a classificação e identificação de fungos utilizam a abordagem polifásica para distinguir as espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*. Os marcadores morfológicos, os perfis de metabólitos secundários e a filogenia molecular, principalmente de sequências dos loci ITS rDNA,  $\beta$ -tubulina, calmodulina e RPB2, têm sido utilizados com sucesso para a maioria das espécies dos três gêneros (Houbraken et al., 2014; Visagie et al., 2014; Yilmaz et al., 2014).

Atualmente, a técnica de espectrometria de massas utilizando ionização a laser auxiliada por uma matriz e analisador de massas por tempo de voo, MALDI-TOF, tem sido empregada também como mais uma ferramenta para o incremento da taxonomia polifásica, sendo útil para o estudo de macromoléculas e largamente usada no estudo de proteômica. Misturas complexas de proteínas e outras macromoléculas podem ser analisadas por MALDI-TOF, onde os espectros de massa gerados correspondem a perfis de massas. Extratos de proteínas totais de bactérias e fungos, ou mesmo células intactas destes, podem

ser analisados, e os perfis de massa gerados podem ser utilizados como conjuntos de caracteres fenotípicos para distinguir espécies (Croxatto et al., 2011; Wieser, 2012; Giebel et al., 2010).

A técnica de MALDI-TOF tem sido amplamente utilizada na identificação de microrganismos de relevância no ambiente hospitalar, que incluem as espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* (Samson et al., 2014; Visagie et al., 2014). Para que a técnica de MALDI-TOF sirva como ferramenta de diagnose rápida de espécies é imprescindível que isolados com identificação validada sejam analisados e seus perfis de massa adicionados a um banco de dados para futuras comparações com amostras desconhecidas e identificação destas. Uma abordagem diferente é a triagem dos isolados de uma coleção não caracterizada utilizando os perfis de massa gerados por MALDI-TOF e a classificação destes por análise multivariada de classificação. A partir dos agrupamentos de isolados obtidos, representantes das prováveis espécies identificadas podem ser submetidos à validação através de um ou mais métodos taxonômicos.

Este estudo foi realizado com a finalidade de caracterizar e identificar 124 isolados de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*, obtidos no Brasil a partir de substratos como solo, sedimento marinho, liteira, e sementes, depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML) e avaliar a congruência entre as técnicas de MALDI-TOF e filogenia. O estudo demonstrou que ambas as técnicas empregadas geraram agrupamentos semelhantes entre os isolados. Para tanto, 98 isolados dos três gêneros foram submetidos à análise multivariada de perfis de massa, gerados por MALDI-TOF e representantes de cada grupo do dendrograma gerado foram analisados por filogenia utilizando sequências de RPB2. Os 26 isolados restantes dos três gêneros, que totalizam os 124 isolados deste estudo, não foram inseridos nos experimentos de MALDI-TOF, porém foram analisados diretamente por filogenia molecular. Assim, os

espectros de massa obtidos poderão ser validados e permitirão futuras comparações com novas amostras e identificação de isolados.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Isolados utilizados no estudo

Foram reativados e separados por morfotipos um total de 124 isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*. Destes, 82 isolados foram obtidos de coleções de culturas compostas durante a execução de projetos de pesquisa desenvolvidos no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos da UFLA nos últimos 10 anos. Estes isolados são provenientes principalmente de amostras de solo, sedimento marinho e liteira (Tabelas 1, 2 e 3, APÊNDICE A). Outros 42 isolados foram obtidos da coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos (LaBioMMi), do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Os isolados foram reativados nos meios extrato de malte ágar (MEA) e Czapek levedura ágar (CYA) (Klich, 2002; Pitt, 2000), avaliados quanto à pureza e esporulação e depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML). Isolados que já haviam sido depositados na CML foram reativados e tiveram sua pureza avaliada. Todos os isolados estão preservados a -80 °C em glicerina 15 % e em tubos com água destilada e esterilizada mantidos a 10 °C.

Um total de 98 isolados foi encaminhado para análise dos espectros de proteínas no MALDI-TOF sendo 28 isolados de *Aspergillus*, 52 isolados *Penicillium* e 18 isolados de *Talaromyces*. Após o agrupamento indicado pelos dendrogramas, um a quatro representantes de cada grupo foram escolhidos para testar a congruência do resultado com a filogenia molecular. Posteriormente,

outros 26 isolados restantes, que não foram analisados por MALDI-TOF, foram também identificados por filogenia (Tabelas 1, 2 e 3, APÊNDICE A).

## 2.2 Caracterização morfológica

Os isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* foram inoculados em três pontos equidistantes em placas de Petri de 90 mm nos meios CYA, MEA, extrato de levedura sacarose ágar (YES), creatina sacarose ágar (CREA) e aveia ágar (OA) e incubados por sete dias a 25 °C no escuro. Também foram inoculados em meio CYA e incubados a 37 °C no escuro, por sete dias. Após a incubação, foram avaliadas as características macromorfológicas como: os diâmetros das colônias, em milímetros, cor, textura, presença ou não de esclerócios, exudados, pigmentos solúveis difusos no ágar e/ou na margem da colônia (Klich, 2002; Pitt, 2000; Yilmaz et al., 2014). As placas foram fotodocumentadas para a realização de pranchas fotográficas. O estudo macromorfológico foi realizado com um total 43 isolados pertencentes a 29 espécies, sendo 13 espécies de *Aspergillus*, 7 de *Penicillium* e 9 de *Talaromyces*.

As características micromorfológicas de 21 isolados pertencentes 21 espécies, sendo 8 espécies de *Aspergillus*, 7 de *Penicillium* e 6 de *Talaromyces* também foram avaliadas a partir de colônias provenientes do meio MEA e incubadas nas mesmas condições anteriormente descritas. Aos fragmentos da colônia foram adicionados a uma gota de álcool para remover as bolhas de ar e excesso conídios e glicerina a 15%. As lâminas foram observadas em um microscópio de luz vertical Leica DM2000 e a aquisição das imagens foi feita por meio do software LAS v.4.5, no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME/UFLA).

### 2.3 Extração de DNA

Os micélios dos isolados viáveis inoculados no meio MEA foram transferidos para tubos de plástico de 2 mL utilizando um espátula. O DNA foi extraído utilizando o kit de extração de DNA Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Biotium<sup>®</sup>) e seu peso molecular e concentração foram estimados por comparação com um marcador de 1 Kb ladder (Invitrogen).

### 2.4 PCR e sequenciamento

Fragmentos do gene que codifica a segunda maior da RNA polimerase II (RPB2) foram amplificados com o par de primers fRPB2-5F (forward; 5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3') e fRPB2-7cR 7cR (reverse; 5'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3') (Liu et al., 1999). A amplificação dos fragmentos do gene RPB2 foi iniciada por um período de 5 min a 95 °C seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 2 minutos a 50 °C com um aumento de 0,2 °C por segundo para 72 °C, 2 minutos a 72 °C e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. A partir da amplificação foram gerados produtos de aproximadamente 860 pb.

Todos os produtos da PCR foram purificados utilizando o *Kit Wizard SV Gel na PCR Clean-Up System* (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, os produtos de PCR purificados foram corados com GelRed (Biotium<sup>®</sup>) e o peso molecular e concentração de cada amostra foram estimados por comparação com um marcador de 1 Kb ladder (Invitrogen) em gel de

agarose 1 %. Os produtos purificados foram enviados para a empresa da Macrogen (Estados Unidos) para sequenciamento.

## 2.5 Edição das sequências e análises filogenéticas

Os eletroferogramas das sequências obtidas foram analisados visualmente utilizando-se o programa SeqAssem® (Hepperle, 2004) e as sequências obtidas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information, NCBI, por meio do programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sequências de RPB2 de isolados tipo e, em alguns casos, isolados de referência, das espécies identificadas por meio das análises por BLAST foram obtidas do GenBank e utilizadas nas análises filogenéticas (Tabela 4, APÊNDICE B).

Os alinhamentos múltiplos das sequências foram realizados no programa MEGA 6.0® (Tamura et al., 2011), bem como a inferência filogenética pelo método de máxima parcimônia (MP). O método de inferência Bayesiana (BI) de filogenia foi feito pelo programa MrBayes 3.12 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). Por meio do programa jModeltest (Darriba et al. 2012), o modelo evolutivo SYM + I + G foi selecionado para a análise dos alinhamentos dos três gêneros estudados. Para cada alinhamento, duas análises de BI foram executadas paralelamente durante  $1,5 \times 10^6$  gerações e terminadas após confirmação de que o desvio padrão entre as análises era igual ou inferior a 0,01. As árvores foram amostradas a cada 500 gerações e 25 % das 6000 árvores geradas foram removidas pelo processo de “*burn-in*” antes da construção da árvore consenso.

Os valores de probabilidade posterior acima de 0.95 e acima de 70 % de bootstrap foram exibidos nos nós das árvores filogenéticas. Como *outgroup* do filograma referente aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foi escolhida a espécie *Talaromyces purpurogenus* e como *outgroup* do filograma referente ao gênero *Talaromyces* foi escolhida a espécie *Penicillium citrinum*.

## 2.6 Espectrometria de massas (MALDI-TOF)

As análises de MALDI-TOF foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), em parceria com o professor Edson Rodrigues Filho como atividade do projeto intitulado Rede de estudos em biodiversidade microbiana: Isolamento, desenvolvimento de estratégias de identificação rápida, conservação, interação entre espécies, e explorações biotecnológicas.

Os isolados foram inoculados, em triplicata, em placas de poliestireno de 60 mm contendo o meio de cultura extrato de malte (MEA) e incubados a 25 °C durante 7 a 10 dias. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, pequenas porções das colônias contendo conídios foram retiradas com palitos de madeira esterilizados e transferidas diretamente para uma placa de amostras (MTP 384 ground steel TF target plate, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), recobertas com a solução da matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico [HCCA, 20 mg.L<sup>-1</sup> em acetonitrila-ácido trifluoroacético aquoso 0.2% (1:1)] e secas ao ar. Cada repetição biológica foi aplicada em três poços da placa e cada poço foi avaliado três vezes. Um total de 27 espectros foi adquirido para cada isolado. Os espectros de massa foram obtidos em um sistema Autoflex Speed TOF/TOF composto por uma fonte de ionização MALDI e um analisador de massas por tempo de voo (TOF), controlado pelo software Flex Control 3.3 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Foram adquiridos e acumulados até 500 espectros por cada poço na placa de amostras e reunidos em um espectro composto. Os espectros foram obtidos no intervalo de massa de 2500 a 20000 DA.

Os dados obtidos foram processados utilizando algoritmos padrão contidos no software Flex Analysis 3.3 (Bruker Daltonics). Os espectros obtidos para cada isolado foram carregados no programa MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) e usados para montagem de um espectro principal (em inglês Main Spectrum ou MSP), onde picos presentes em pelo menos 25 % dos espectros foram incorporados ao respectivo MSP. Os MSPs foram identificados com o código do isolado e submetidos à análise multivariada de classificação para a obtenção de um dendrograma com a disposição de todos os isolados.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análise de MALDI-TOF em espécies de *Aspergillus*

O dendrograma de perfis de massa obtidos por MALDI-TOF separou 28 isolados de *Aspergillus* em sete grupos e mais 10 ramos contendo apenas um isolado cada, indicando um total de 16 espécies (Figura 3). A análise filogenética realizada com 26 destes isolados confirmou a distinção de 17 espécies, que foram nomeadas no dendrograma de MALDI-TOF de acordo com a identificação mais provável obtida pela filogenia molecular (Figura 4).

Cinco isolados foram identificados como *Aspergillus terreus* e três como *Aspergillus welwitschiae*. Cinco espécies foram representadas por dois isolados. O restante das espécies foi representado por apenas um isolado. A disposição das espécies no dendrograma de MALDI-TOF não mostrou correspondência com as relações filogenéticas entre estas; e.g. não há qualquer agrupamento entre diferentes espécies das seções *Nigri* (*Aspergillus fijiensis*, *A. welwitschiae*, *Aspergillus* c.f. *tubingensi*) e *Flavi* (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus nomius*).

Além de diferenciar as espécies da seção *Nigri* o dendrograma gerado também permitiu separar as espécies de seções próximas como *A. cf. tubingensis* e *A. chevalieri*. Hettick et al. (2011) não conseguiram essa separação sem a aplicação de um pré-tratamento no meio de cultura com triciclazol para inibir a produção de melanina sintetizada por fungos como *Aspergillus niger* com a finalidade de obter espectros de melhor qualidade e, conseqüentemente, discriminar as espécies presentes no banco de dados destes espectros.

A distância de separação entre espécies no dendrograma foi superior a 600 unidades na maioria dos casos, sendo a distância máxima entre isolados da mesma espécie geralmente inferior a 300 unidades (Figura 3). A exceção a este

padrão foi a separação entre o isolado CML 2692 e o grupo formado pelos isolados CML 2643 e CML 2680 (*Aspergillus amoenus*). Estes foram separados por uma distância de 400 unidades e considerados como sendo duas espécies, *A. amoenus* e *Aspergillus* aff. *amoenus* (CML 2692), resultado embasado pela filogenia (Figura 4).

No estudo de Alanio et al. (2011) que objetivaram projetar o banco de dados de e validá-lo para identificação das espécies clínicas de *Aspergillus*, também foi possível discriminar espécies de *Aspergillus* de diferentes seções como: *Fumigati*, *Flavi*, *Terrei*, *Nigri*, *Nidulantes*, *Usti* e *Circumdati*. Dos 140 isolados utilizados para contrastar com 28 espécies de *Aspergillus* clinicamente relevantes, as quais compunham o banco de dados de isolados obtidos de várias coleções de cultura, 138 foram corretamente identificados. Todos os isolados utilizados nos estudos de Alanio et al. (2011) foram previamente caracterizados por morfologia e pela similaridade com sequências do Genbank referentes aos loci  $\beta$ -tubulina e calmodulina. Os dois isolados que não puderam ser identificados pelo MALDITOF foram identificados pelas sequências das regiões gênicas citadas anteriormente, e pertenciam a espécie *A. fumigatus*, uma vez que não puderam ser identificados morfologicamente, devido à ausência da conidiogênese para um isolado e de esporulação atípica para o outro.

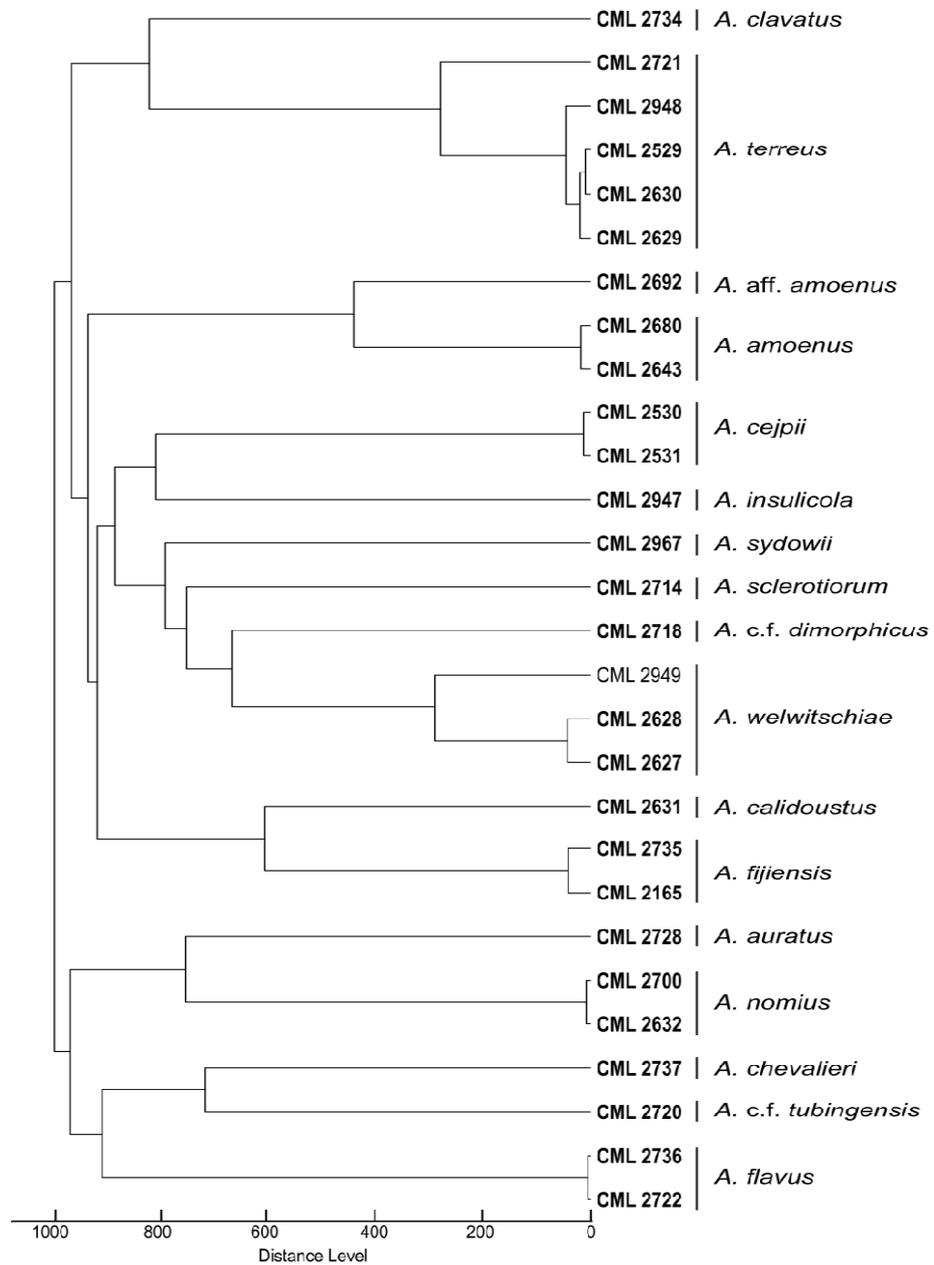


Figura 3 Dendrograma gerado com base nos espectros de massa obtidos das espécies de *Aspergillus*. Os códigos em negrito indicam isolados analisados também por filogenia.

### 3.2 Análise filogenética em espécies de *Aspergillus*

O tamanho total do alinhamento para *Aspergillus* foi de 1014 caracteres, dos quais 446 foram parcimoniosamente informativos. As espécies deste gênero representadas no filograma obtiveram 95-100 % de suporte por probabilidade posterior (pp.) e bootstrap acima de 70 % nos nós que delimitam as seções de *Aspergillus* (Figura 4).

Dos 31 isolados de *Aspergillus* utilizados para inferência filogenética, 20 espécies foram detectadas, incluindo espécies cuja identificação necessita de confirmação, indicadas como c.f. e espécies filogeneticamente próximas às espécies de referência já descritas, como *A. aff. raperi* (CML 3002), *A. aff. amoenus* (CML 2692) e *A. aff. nutans* (CML 2996, CML 2999, CML 3000) (Tabela 1, APÊNDICE A). No caso da espécie *A. amoenus* este fato fica evidente no dendrograma (Figura 3), que também sugere a relação de proximidade dos isolados filogeneticamente identificados como *A. amoenus* e o isolado que representa *A. aff. amoenus*. Os isolados CML 2718 e CML 2720 foram classificados aqui como *A. c.f. dimorphicus* e *A. c.f. tuingensis*, respectivamente, pois a distância filogenética aparente nos ramos deixa a identificação indeterminada, sendo necessários mais dados, como a utilização de mais genes para confirmar que estes isolados pertencem a essas espécies.

Todas as espécies no filograma foram pertencentes aos 4 subgêneros existentes na classificação atual *Circumdati*, *Fumigati*, *Nidulantes* e *Aspergillus*, bem como 12 das 19 seções atualmente propostas por Houbraken et al. (2014) que são: *Versicolores*, *Raperi*, *Usti*, *Clavati*, *Fumigati*, *Cervini*, *Flavi*, *Cremeri*, *Aspergillus*, *Nigri*, *Terrei* e *Circumdati*. A filogenia inferida pelas sequências do locus RPB2, que foi utilizada neste estudo, não oferece suporte à monofilia das seções de *Aspergillus*.

As análises filogenéticas deste estudo mostraram que a seção *Nigri* se divide em dois clados. O primeiro clado acomodou dois isolados da CML que puderam ser identificados como *A. cf. tubingensis* (CML 2720) e *A. welwitschiae* (CML 2627, CML 2628), enquanto o segundo clado acomodou os isolados CML 2165 e CML 2735, identificados como *A. fijiensis*. Uma topologia semelhante foi mostrada na filogenia da seção *Nigri* no estudo de Varga et al. (2011) baseado em sequências de calmodulina e  $\beta$ -tubulina. Os resultados mostraram que as espécies unisseriadas e bisseriadas desta seção foram filogeneticamente separadas em clados distintos. As espécies bisseriadas, pertencentes ao clado *A. niger*, formavam três subclados, dois dos quais continham *A. tubingensis* e *A. awamori* (= *A. welwitschiae*) e o outro clado mais afastado deste correspondia a espécies unisseriadas, que incluía a espécie *A. fijiensis*. Os resultados mostrados aqui em relação à micromorfologia de alguns isolados representantes da seção *Nigri* também foram congruentes aos resultados de Varga et al. (2011).

Em estudo posterior, Hong et al. (2013) investigaram as posições taxonômicas da seção *Nigri* e demonstraram erros na denominação da espécie tipo de *A. awamori*. Com base nos dados filogenéticos obtidos a partir das sequências dos loci rDNA-ITS, calmodulina e  $\beta$ -tubulina e perfis de RAPD, foi demonstrado que alguns isolados erroneamente identificados como *A. awamori* pertenciam a espécie *A. welwitschiae*, com descrição original da Namíbia.

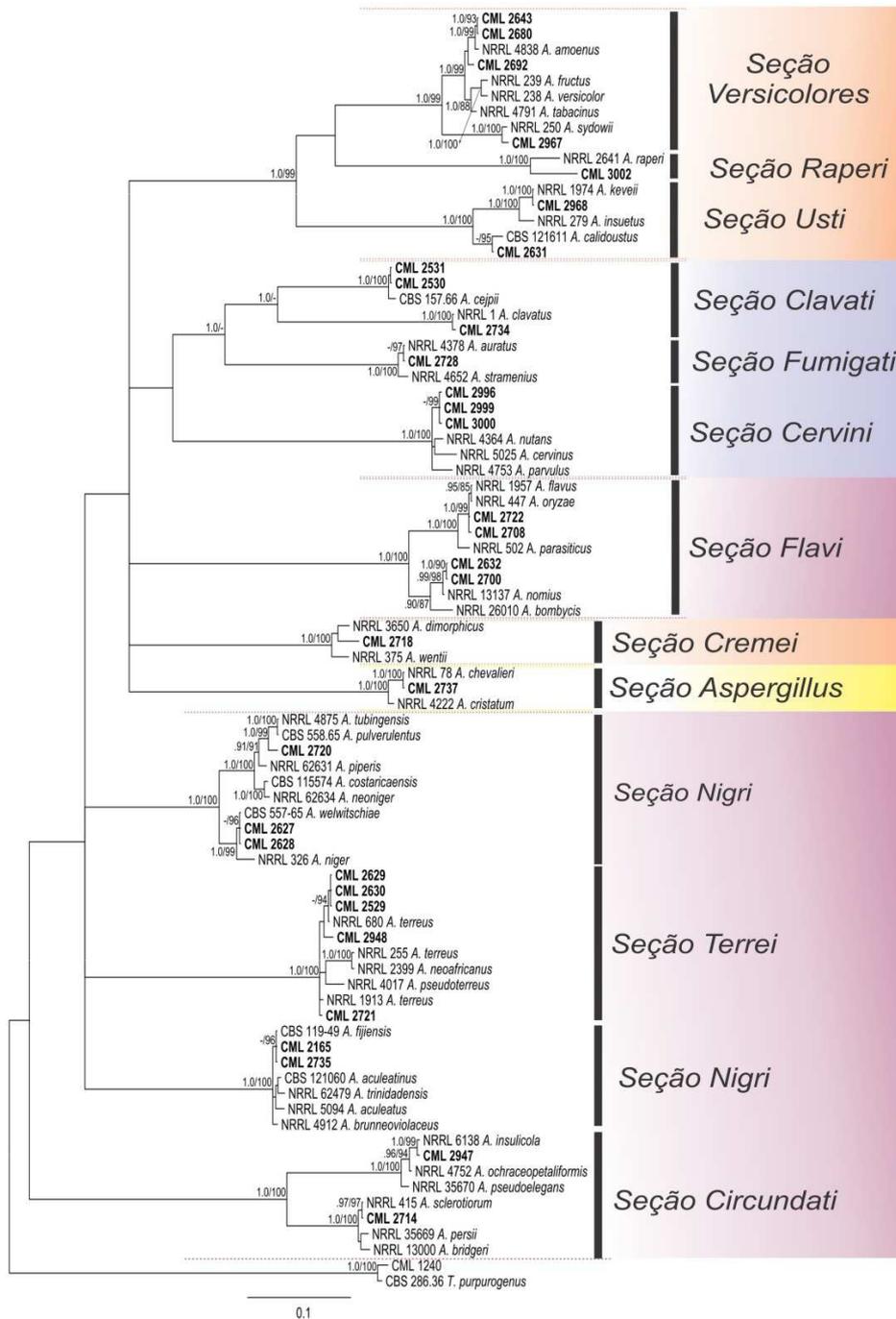
No filograma, o clado correspondente à seção *Terrei* apresentou subclados compostos por três linhagens de *A. terreus*, o que demonstra que a região RPB2 não ofereceu boa resolução para diferenciar as diferentes espécies da seção. O padrão de agrupamento no dendrograma para as linhagens de *A. terreus* também mostrou-se bastante semelhante com a filogenia. As três linhagens de *A. terreus* utilizadas na filogenia deste trabalho também fizeram parte dos estudos filogenéticos de Samson et al. (2011a) e Peterson (2008) que

empregaram, respectivamente, os loci  $\beta$ -tubulina, calmodulina e rDNA ITS e também  $\beta$ -tubulina, calmodulina, LSU rDNA e RPB2. Essas linhagens também ocorreram em subclados bem definidos, porém sem comprovação de que representam espécies distintas.

A seção *Cremeri*, apesar de ter sido aceita no subgênero *Circumdati* nos estudos de Peterson (2008), posteriormente foi reclassificada por Houbraken e Samson (2011) e passou a pertencer ao subgênero *Aspergillus*. Segundo os estudos atuais realizados por Houbraken et al. (2014), baseados na filogenia de 25 loci pelo método de máxima verossimilhança, esta seção atualmente localiza-se no subgênero *Nidulantes* devido ao agrupamento, com moderado valor de bootstrap (75 %), da espécie *A. wentii*, a qual pertence à seção *Cremeri* com membros da seção *Nidulantes*. Como as topologias das árvores deste trabalho obedecem às modificações taxonômicas atuais, na filogenia de *Aspergillus*, a seção *Cremeri* foi considerada também como pertencente ao subgênero *Nidulantes*.

Em nível subgenérico, o agrupamento do subgênero *Circumdati* também não mostrou-se coeso, pois as seções membros deste subgênero como *Circumdati*, *Nigri* e *Terrei* encontraram-se mais próximas na parte basal da árvore filogenética, enquanto a seção *Flavi*, também pertencente ao subgênero *Circumdati*, se posiciona nitidamente mais afastada, demonstrando que, em relação aos subgêneros, as espécies de *Aspergillus* também não são monofiléticas para a região RPB2. Ao contrário do estudo de Peterson (2008), que investigou as relações filogenéticas dentro do gênero *Aspergillus*, baseado na filogenia dos loci

Figura 4 Árvore filogenética gerada a partir de sequências de RPB2 mostrando a relação entre as espécies de várias seções em *Aspergillus*. Os subgêneros estão indicados pelo padrão de cores: Laranja = *Nidulantes*, Azul = *Fumigati*, Amarelo = subgênero *Aspergillus* e Roxo = subgênero *Circumdati*. A árvore foi enraizada com *Talaromyces purpurogenus*. Valores de suporte nos nós  $\geq 0.95$  de pp. e  $\geq 70$  % bootstrap são mostrados.



5.8S rDNA, 28S rDNA, e evidenciou no seu estudo três clados principais, sendo o maior clado composto pelos subgêneros *Circumdati* e *Fumigati*, um contendo o subgênero *Nidulantes* e o outro contendo os membros do subgênero *Aspergillus*. A filogenia baseada na sequência de RPB2 e o dendrograma gerado a partir da técnica de MALDI-TOF foram congruentes para o gênero *Aspergillus*.

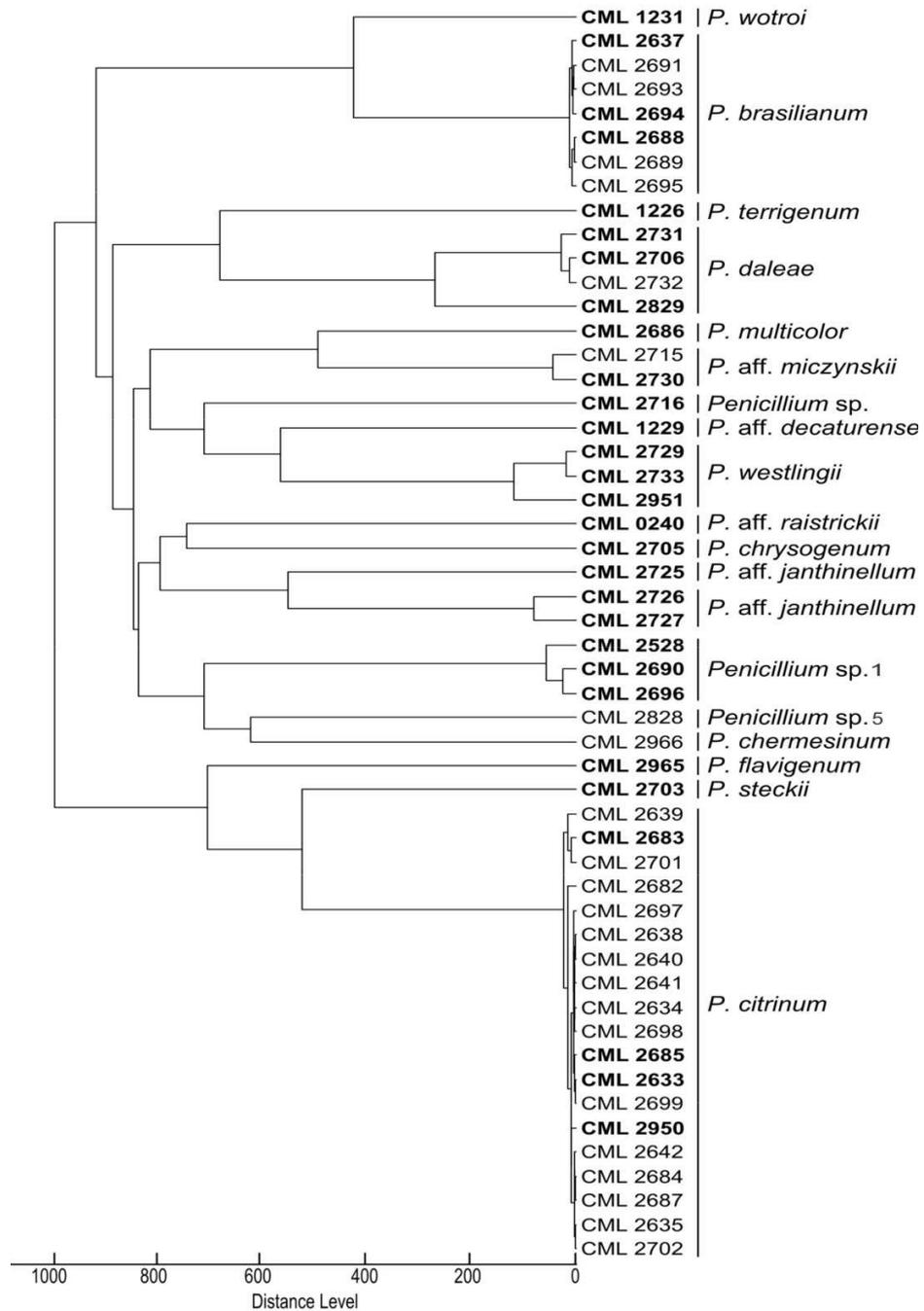
### 3.3 Análise de MALDI-TOF em espécies de *Penicillium*

Cinquenta e dois isolados de *Penicillium* foram analisados por MALDI-TOF. O dendrograma gerado foi composto por 19 ramos (Figura 5), dos quais 16 foram confirmados como espécies distintas na análise filogenética (Figura 6). Foram nomeadas 11 espécies com base nos resultados de filogenia, e mais quatro espécies foram tentativamente identificadas como próximas ou afins, “aff.”, a espécies já descritas. As espécies restantes, que não puderam ser nomeadas na análise filogenética subsequente, foram identificadas como *Penicillium* sp. 1-5.

Dezenove isolados foram agrupados em *Penicillium citrinum*, sete isolados em *Penicillium brasilianum*, cinco em *Penicillium daleae*, três isolados em *Penicillium westlingii* e *Penicillium* sp. 1 e dois isolados em *Penicillium* aff. *miczynskii*. Onze espécies foram representadas por um único isolado (Figura 5).

Chen e Chen (2005) obtiveram identificação de seis espécies do gênero *Penicillium*: *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. digitatum*, *P. italicum* (espécies terverticiladas) e *P. pinophilum* (biverticilado), que geraram perfis únicos de espectros.

Figura 5 Dendrograma gerado com base nos espectros de massa obtidos das espécies de *Penicillium*. Os códigos em negrito indicam isolados analisados também por filogenia.



Uma incongruência foi observada entre o resultado do dendrograma e a filogenia dos isolados de *Penicillium*. O isolado CML 2725 formou um ramo vizinho, porém distinto, ao grupo formado pelos isolados CML 2726 e CML 2727, com uma distância relativa de 600 unidades (Figura 5). Estes três isolados, no entanto, formaram um único grupo monofilético nas análises filogenéticas (Figura 6).

Tal discrepância pode ser atribuída ao fato de que apenas micélio foi amostrado para análise de MALDI-TOF com sete dias, pois tais isolados produziram apenas a fase teleomórfica em placa após duas semanas (dados não mostrados). Conforme Croxatto et al. (2011), os sinais espectrais de células intactas podem ser influenciados pelo fenótipo do fungo, que incluem esporos, corpo de frutificação, conidióforos, conídios ou ascos, estruturas aéreas e a heterogeneidade da hifa etc. Os micélios vegetativos apresentam diferentes zonas que correspondem ao de crescimento apical, absorção de nutrientes e armazenamento equivalente a diferentes idades ou desenvolvimento. Assim, a variação das biomoléculas em células intactas pode influenciar a reprodutibilidade espectral em medições repetidas da mesma amostra.

O isolado CML 2828 (*Penicillium* sp. 5) foi considerado como pertencente a uma espécie distinta, embora não tenha sido possível obter sequência de RPB2 deste isolado. Já o isolado CML 2966 foi identificado como *Penicillium chermesinum* com base na sua sequência de ITS rDNA, obtida em outro estudo conduzido no laboratório (dados não mostrados).

#### **3.4 Análise filogenética das espécies de *Penicillium***

Em relação ao gênero *Penicillium* o alinhamento apresentou um tamanho total de 912 caracteres dos quais foram parcimoniosamente

informativos 407. A filogenia foi bem suportada por valores de pp. e 95-100 % e acima de 70 % de *bootstrap* na maioria dos nós (Figura 6).

Dos 40 isolados de *Penicillium* utilizados para inferência filogenética com a região gênica RPB2, dezoito espécies foram detectadas (Tabela 2, APÊNDICE A). Destas, quatro espécies provavelmente novas, porém não identificadas, que formaram grupos monofiléticos com espécies já descritas, sendo denominados de: *P. aff. raistrickii* (CML 240), *P. aff. miczynskii* (CML 2715 e CML 2730), *P. aff. decaturense* e *Penicillium aff. herquei* (CML 3020).

Cinco espécies não identificadas pela filogenia foram agrupadas por números de acordo com seu agrupamento nos clados (Tabela 2, APÊNDICE A). *Penicillium* sp. 1 inclui os isolados CML 2690, CML 2696 e CML2528, localizadas no mesmo clado e dentro da seção *Fasciculata*, *Penicillium* sp. 2 compreende os isolados CML 2716 e CML 3022, unidos no mesmo clado dentro da seção *Lanata-Divaricata*. Os demais isolados de *Penicillium* não identificados formaram linhagens distintas: CML 3024, *Penicillium* sp. 3, também da seção *Lanata-divaricata* e CML 3011, *Penicillium* sp. 4, na Seção *Gracilenta* (Figura 6).

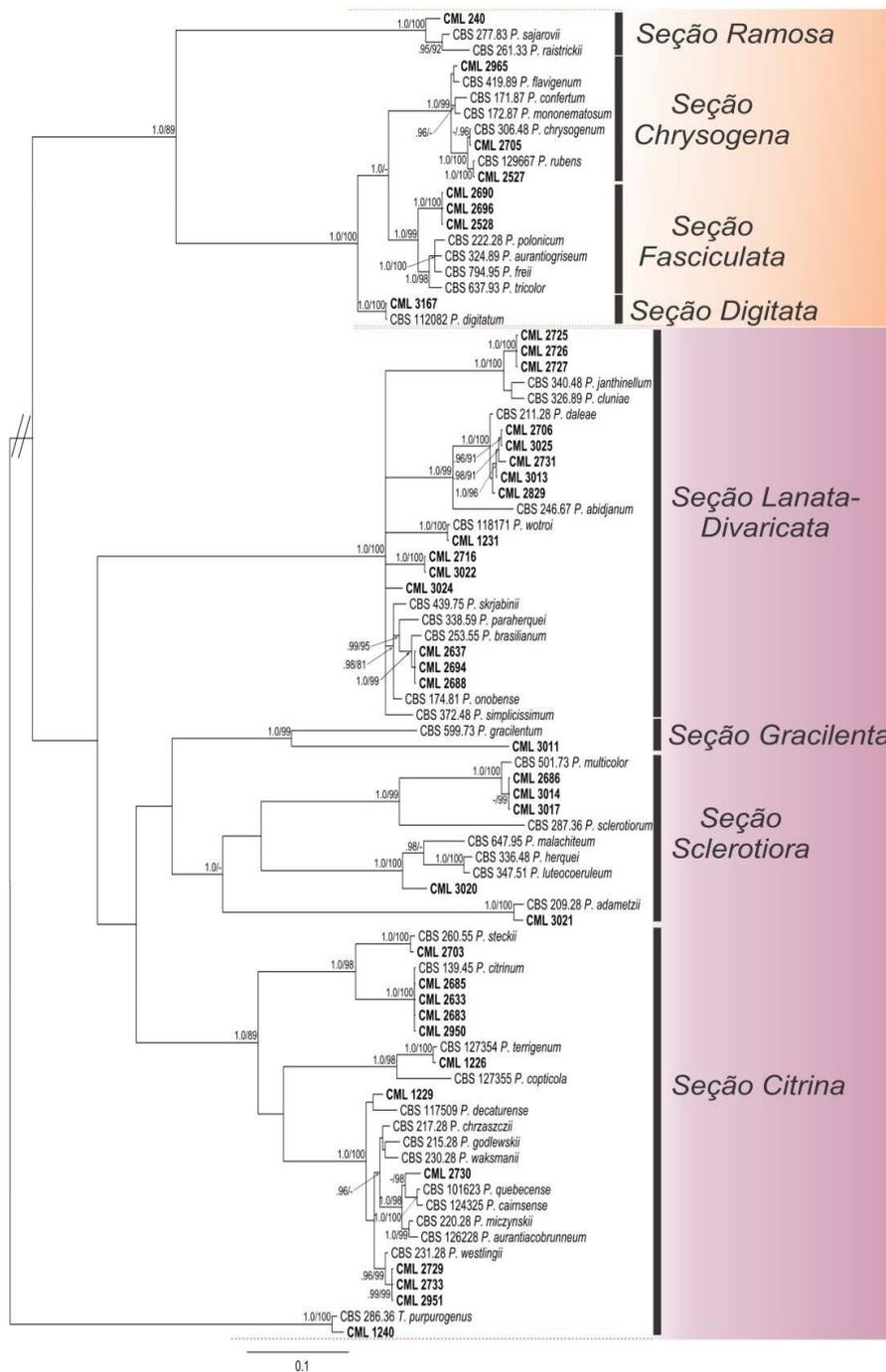
O filograma gerado evidenciou os dois subgêneros *Aspergilloides* e *Penicillium*, aceitos atualmente, além de 8 das 25 seções presentes em *Penicillium* de acordo com Houbraken et al. (2014): *Ramosa*, *Chrysogena*, *Fasciculata*, *Digitata*, *Lanata-divaricata*, *Gracilenta*, *Sclerotiora* e *Citrina*. Com exceção de *P. aff. janthinellum*, as demais espécies do gênero *Penicillium* presentes no filograma e que também constam no dendrograma de MALDI-TOF foram agrupadas de forma congruente.

Embora Houbraken e Samson (2011) tenham afirmado que para o gênero *Aspergillus* as classificações fenotípicas dos subgêneros e seções correspondam, em grande parte, com a filogenia atual, o mesmo não se aplica ao gênero *Penicillium*. Esses autores propuseram a divisão do gênero *Penicillium*

em dois subgêneros e 25 seções, a partir da filogenia multilocus e confirmaram as observações feitas em outros estudos realizados anteriormente, os quais demonstram que caracteres frequentemente utilizados em sistemas de classificação de subgêneros e seções, como ramificações dos conidióforos de *Penicillium* e taxas de crescimento em meios de cultura são incongruentes com a filogenia. De acordo com Houbraken et al. (2014), atualmente não é possível reconhecer todas as seções sem empregar os dados de sequências de DNA e o ideal seria formular um sistema de classificação que incluísse características fenotípicas. Este sistema de classificação proposto seria o ponto de partida para investigação dos caracteres fenotípicos úteis para a classificação.

Na filogenia do gênero *Penicillium* apresentada neste trabalho, os clados mostraram congruência com os resultados obtidos por Houbraken e Samson (2011), que reclassificaram as espécies deste gênero priorizando os aspectos filogenéticos. Uma vez que a prioridade nas análises do presente estudo também foi dada às técnicas filogenéticas e de espectrometria de massas, os caracteres morfológicos aqui apresentados, também permanecem no mesmo estado de incongruência evidenciado Houbraken e Samson (2011).

Figura 6      Árvore filogenética a partir de RPB2 mostrando a relações entre as espécies de várias seções em *Penicillium*. Os subgêneros estão indicados pelo padrão de cores: Laranja = *Penicillium* e Roxo = *Aspergilloides*. A árvore foi enraizada com *Talaromyces purpurogenus*. Valores de suporte nos nós  $\geq 0.95$  de pp. e  $\geq 70$  % bootstrap são mostrados.



### 3.5 Análise de MALDI-TOF em espécies de *Talaromyces*

Dez espécies foram distinguidas no dendrograma obtido com os dados de MALDI-TOF de 18 isolados de *Talaromyces* (Figura 7). A análise filogenética de 14 destes isolados confirmou a correta identificação das espécies pela técnica de MALDI-TOF (Figura 8). Cinco isolados foram identificados como *Talaromyces amestolkiae*, quatro isolados como *Talaromyces pinophilus* e dois como *Talaromyces wortmannii*. As demais espécies foram representadas por apenas um isolado (Figura 7).

Nos estudos de Hettick et al. (2008) também foram observadas 100 % de identificações corretas por meio da técnica de MALDI-TOF para espécies de *Penicillium* pertencentes aos subgêneros *Biverticillium* (que atualmente inclui espécies do gênero *Talaromyces*) e do subgênero *Furcatum* (atualmente sinonimizado com o subgênero *Aspergilloides*).

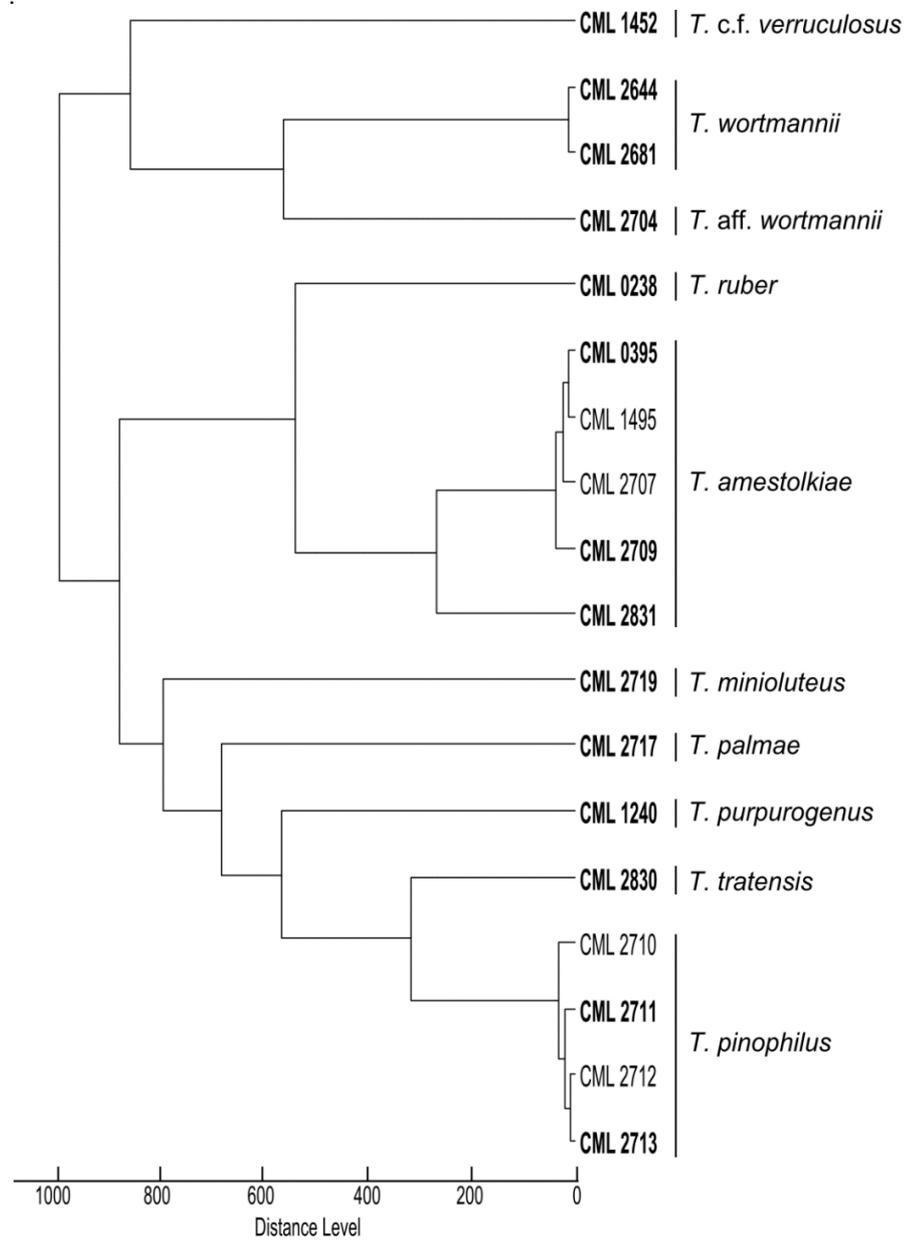


Figura 7 Dendrograma gerado com base nos espectros de massa obtidos das espécies de *Talaromyces*. Os códigos em negrito indicam isolados analisados também por filogenia.

### 3.6 Análise filogenética em espécies de *Talaromyces*

Em relação à filogenia do gênero *Talaromyces* (Figura 8), o tamanho total do alinhamento foi de 979 caracteres, dos quais 404 foram parcimoniosamente informativos. Todas as espécies representadas no filograma também mostraram apoio estatístico bem suportado nos nós, com valores de pp. e bootstrap de 95-100 % e acima de 70 % (Figura 8).

Dos 24 isolados de *Talaromyces* utilizados para inferência filogenética com a região gênica RPB2, doze espécies foram detectadas, incluindo a espécie nomeada com *T. aff. wortmannii*, que integrou o agrupamento monofilético com a espécie já descrita *T. wortmannii* (Tabela 3, APÊNDICE A). Duas não foram detectadas, devido às distâncias filogenéticas apresentadas em relação às respectivas espécies de referência. Assim, as espécies não identificadas foram agrupadas por números de acordo com seu agrupamento nos cladogramas e denominadas como *Talaromyces* sp. 1 (CML 3006, CML 3007), localizadas no clado da seção *Talaromyces* e *Talaromyces* sp. 2 (CML 2827), localizada no clado da seção *Subinflati* (Tabela 3, APÊNDICE A).

A filogenia do gênero *Talaromyces* abordada neste trabalho demonstrou a formação de grupos monofiléticos, que refletem a abordagem filogenética atual. Todas as espécies do gênero *Talaromyces* foram formalmente unificadas com espécies de *Penicillium* do subgênero *Biverticillium* conforme os estudos de Samson et al. (2011b). Os isolados presentes no filograma foram dispostos em 4 das 7 seções de acordo com Yilmaz et al. (2014), as quais são: *Talaromyces*, *Trachyspermi*, *Islandici* e *Subinflati*. O maior clado foi composto por algumas espécies da seção *Talaromyces*, que são parte do complexo *T. purpurogenus* que, segundo Yilmaz et al. (2012), compreende as espécies além de *T. purpurogenus*, tais como *T. amestolkiae*, *T. ruber* e *T. stolii*.

Os isolados CML 2644 e CML 2681 formaram um clado com a espécie tipo *P. concavorugulosum*, a qual é considerada como espécie não válida e, por isso, não renomeada como *Talaromyces* nos trabalhos de Samson et al. (2011b). Este clado, mais o isolado CML 2704, os tipos de *Talaromyces wortmannii* (CBS 391.48) e *Talaromyces variabilis* formaram um grupo monofilético bem suportado.

Yilmaz et al. (2014) consideraram que *P. concavorugulosum* e *T. variabilis* são sinônimos de *T. wortmannii* baseado na filogenia multilocus das regiões ITS,  $\beta$ -tubulina, calmodulina e RPB2. Esta informação, portanto, torna coerente os resultados obtidos neste estudo, que mostra o agrupamento das espécies *Penicillium concavorugulosum*, *T. variabilis* e *T. wortmannii* no clado da seção *Islandi*.

O isolado CML 2704 mostrou-se filogeneticamente próximo a *T. wortmannii* sendo considerado, portanto, como *T. aff. wortmannii*. Esta relação evidenciada na filogenia foi corroborada também pela análise de MALDI-TOF (Figura 7). O agrupamento gerado no dendrograma para os isolados do gênero *Talaromyces* a partir da análise dos espectros de massa demonstrou equivalência para os mesmos isolados presentes na filogenia.

### 3.7 Caracterização morfológica

#### 3.7.1 Caracterização morfológica em espécies de *Aspergillus*

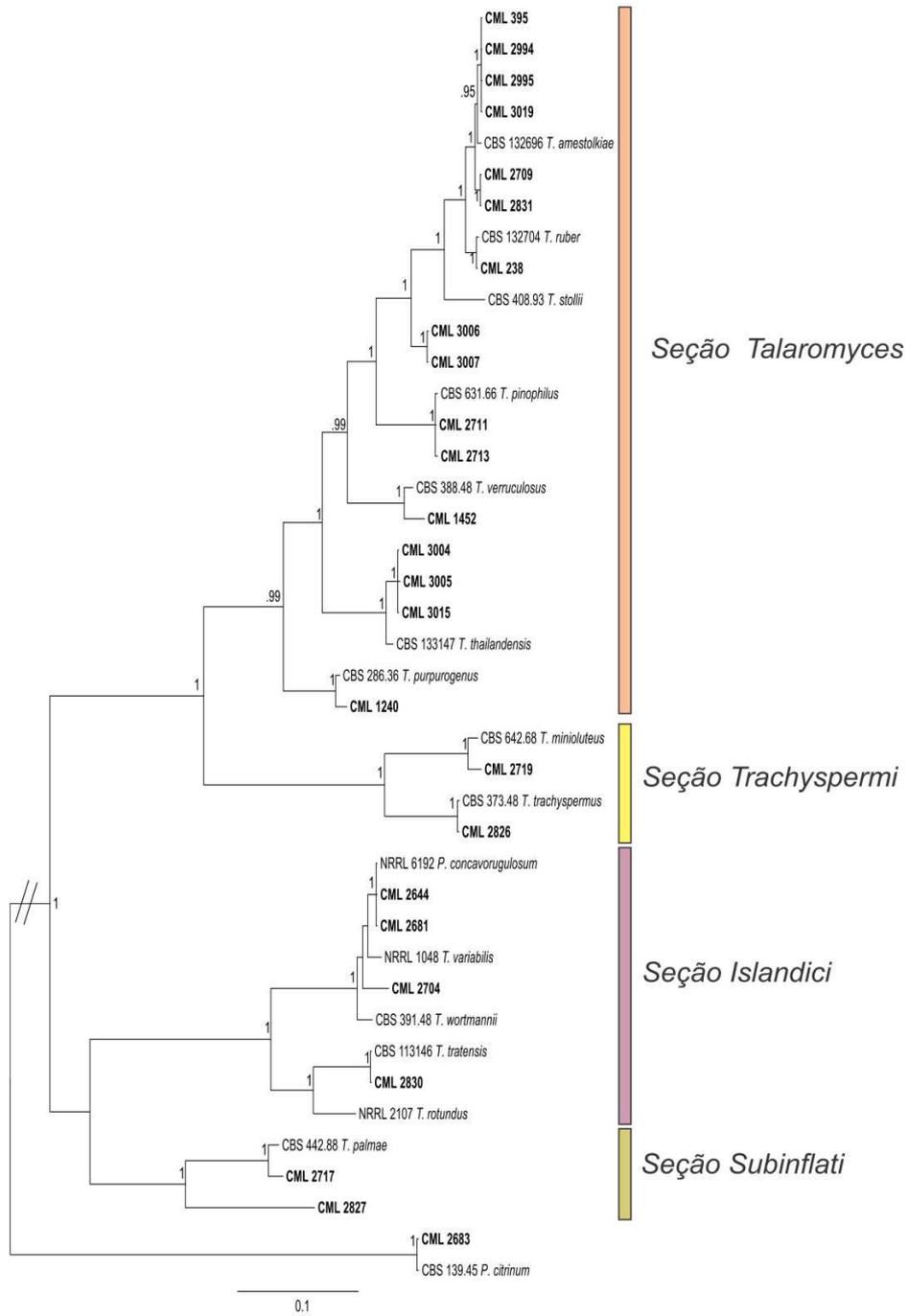
Foram selecionados 20 isolados pertencentes a 13 espécies de *Aspergillus* contidos na análise filogenética e/ou agrupadas no dendrograma para serem caracterizadas pela abordagem macromorfológica e oito espécies também selecionadas foram analisadas por caracteres micromorfológicos (Tabelas 5 e 8; APÊNDICE C). A maioria das espécies identificadas filogenia e pelo dendrograma gerado pelo MALDI-TOF apresentou concordância com os padrões morfológicos (Samson et al., 2011a; Klich, 2002; Varga et al., 2011; Houbraken et al., 2014).

Foram encontrados padrões de variação macromorfológica em alguns isolados pertencentes às espécies de *A. terreus* e *A. flavus*, sendo três e dois padrões respectivamente (Figuras 9 e 10). Além das diferenças sutis no aspecto das colônias e taxas de crescimento micelial, as diferenças entre os isolados das espécies de *A. terreus* também foram verificadas no por meio do filograma e do dendrograma gerado neste estudo.

Figura 8    Árvore filogenética gerada a partir de sequências de RPB2 mostrando a relações entre as espécies de várias seções em *Talaromyces*. As seções estão

indicadas no filograma. A árvore foi enraizada com *Penicillium citrinum*. Valores de suporte nos nós  $\geq 0.95$  de pp. e  $\geq 70$  % bootstrap são mostrados.





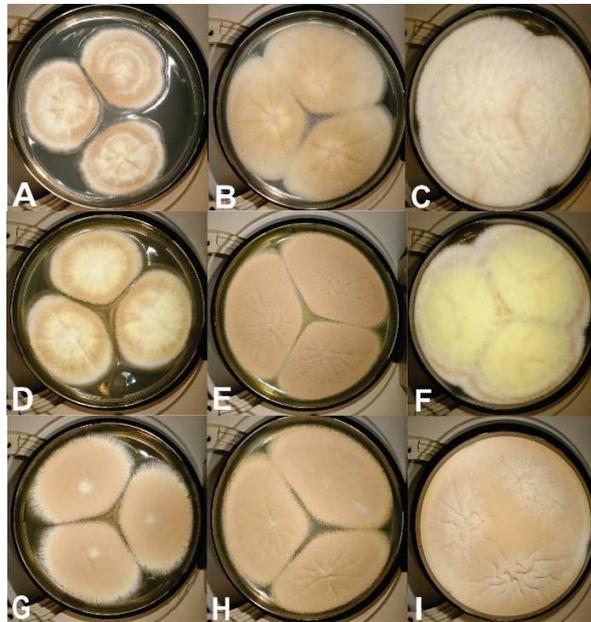


Figura 9 *Aspergillus terreus*. Da esquerda para direita: CYA a 25 °C, CYA a 37 °C e YES a 25 °C. A-C CML 2630; D-F CML 2721 e G-I CML 2948.

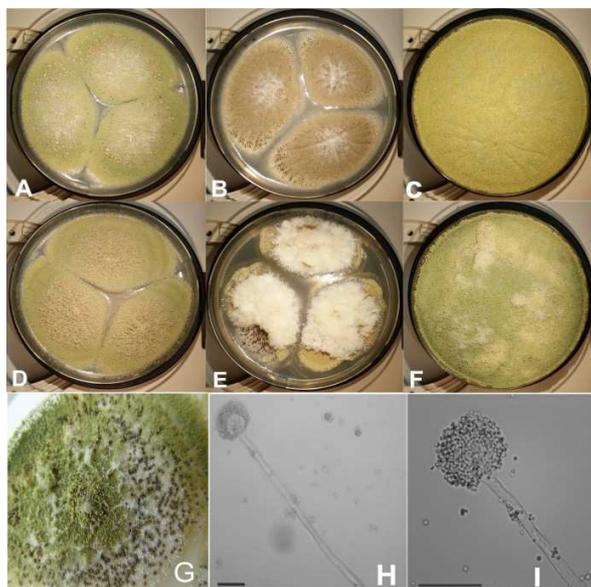


Figura 10 *Aspergillus flavus*. Da esquerda para direita: CYA a 25 °C, CYA a 37 °C e YES a 25 °C. A-C CML 2722; D-F CML 2736; G escleródios; H-I conidióforo.

### 3.7.2 Caracterização morfológica em espécies de *Penicillium*

Foram selecionados sete isolados pertencentes a sete espécies de *Penicillium* contidos na análise filogenética e/ou agrupadas no dendrograma para serem caracterizadas pela abordagem macromorfológica e sete espécies também selecionadas foram analisadas por caracteres micromorfológicos (Tabelas 6 e 9, APÊNDICE C). Os isolados de *Penicillium* caracterizados morfológicamente não apresentaram padrões de variação morfológica intraespecífica e foram congruentes com as descrições apresentadas na literatura de Pitt (2000) e Houbraken e Samson (2011).

### 3.7.3 Caracterização morfológica em espécies de *Talaromyces*

Em relação ao gênero *Talaromyces* foram selecionados 16 isolados pertencentes a nove espécies de *Talaromyces* contidos na análise filogenética e/ou agrupadas no dendrograma para serem caracterizadas pela abordagem macromorfológica e seis espécies também selecionadas foram analisadas por caracteres micromorfológicos (Tabelas 7 e 10, APÊNDICE C).

Os resultados mostraram que as espécies do complexo *T. purpurogenum* são facilmente distinguíveis entre si de acordo com Yilmaz et al. (2012) e Yilmaz et al. (2014). Entretanto, as espécies *T. amestolkiae* (Figura 11) e *T. thailandensis* apresentaram, respectivamente, 4 e 3 padrões de variações intraespecíficas na macromorfologia, o que torna as fronteiras de delimitação dentro destas respectivas espécies mais difícil.

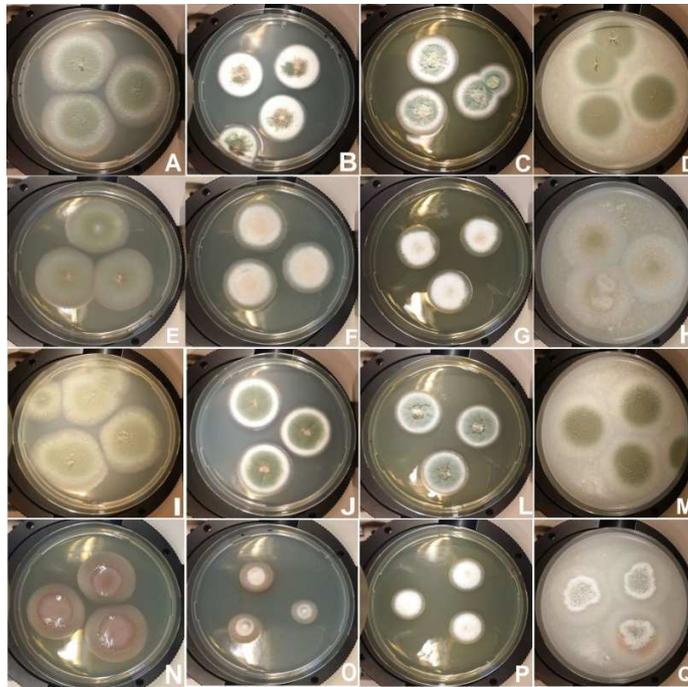


Figura 11 *Talaromyces amestolkiae*. Da esquerda para a direita, usou-se os meios: MEA, CYA, YES e OA a 25 °C. A-D CML 1495; E-H CML 2709; I-M CML 2707; N-Q 2831.

#### 4 CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos pelo filograma e dendrograma foi possível distinguir 20 espécies de *Aspergillus*, 19 espécies de *Penicillium* e 12 espécies de *Talaromyces*.

A região RPB2 sozinha não foi satisfatória para a delimitação das espécies.

A técnica de espectrometria de massas, MALDI-TOF, aliada a análises filogenéticas, foi eficiente na identificação das espécies.

As espécies identificadas por filogenia serão utilizadas para validar a biblioteca de espectros de MALDI-TOF.

## REFERÊNCIAS

Alanio A, Beretti JL, Dauphin B, Mellado E (2011) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect* 17: 750–755.

Batista A, Maia H (1957) *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 15(1): 160. Disponível em: < batista.fungibrasil.net/pdf/IMUR012.pdf> Acesso em: 22 jan. 2015.

Bennet JW (2010) An overview of the genus *Aspergillus*. Disponível em: < http://open-access-biology.com/aspergillus/aspergilluschl.pdf> Acesso em: 22 nov. 2014

Croxatto A, Prod'hom G, Greub G (2012) Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *Microbiol Rev* 36: 380–407.

Chen HY, Chen YC (2005) Characterization of intact *Penicillium* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Comm Mass Spectrometry* 19: 3564–3568.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Meth* 9: 772.

Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, et al. (2010) Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol* 71: 149–184.

Hong SB, Yamada O, Samson RA (2013) *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia. *Plos One* 8: 1-9.

Hepperle D (2004) SeqAssem©: a sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Klein Raden: Sequantix, 2004. Disponível em: <http://www.sequantix.de>. Acesso em: 05 abr. 2014.

Houbraken J, Samson RA (2011) Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud Mycol* 1: 1-51.

Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA (2011) Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*. *Stud Mycol* 70: 53–138.

Houbraken J, Vries de RP, Samson RA (2014) Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Adv Appl Microbiol* 86: 199–249.

Klich MA, Pitt JI (1988) A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO North Ryde, NSW, Australia. p. 116.

Liu Y, Whelen S, Hall BD (1999) Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol* 16: 1799–1808.

Peterson SW (2008) Phylogenetic analyses of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100: 205–226.

Pitt JI (2000) A laboratory guide to common *Penicillium* species. CSIRO North Ryde, NSW, Australia.

Rivera KG, Seifert KA (2011) A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. *Stud Mycol* 70: 139–158.

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.

Samson RA, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J (2011a) New species in *Aspergillus* section *Terrei*. *Stud Mycol* 69: 39–55.

Samson RA, Yilmaz N, Houbraken J, Spierenburg H, et al. (2011b) Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Stud Mycol* 70: 159–183.

Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, et al. (2014) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 78: 141–173.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, et al. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.

Varga J, Kocsubé S, Tóth B, Frisvad JC, et al. (2007) *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1925–1932.

Varga J, Frisvad JC, Kocsubé S, Brankovics B, et al. (2011) New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol* 69: 1–17.

Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, et al. (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol* 78: 343–371.

Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S (2012) MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 965–974.

Yilmaz N, Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA (2014) Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Stud Mycol* 78: 175–341.

Yilmaz N, Houbraken J, Hoekstra ES, Frisvad JC, et al. (2012) Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. *Persoonia* 29: 39 – 54.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A

Tabela 1 Isolados do gênero *Aspergillus* utilizados neste estudo.

CML	Espécie	Substrato	Local	Gene sequenciado	MALDI-TOF
2629	<i>Aspergillus terreus</i>	sedimento marinho	CE	RPB2	x
2721	<i>A. terreus</i>	semente de soja	Ibiá, MG	RPB2	x
2630	<i>A. terreus</i>	sedimento marinho	CE	RPB2	x
2948	<i>A. terreus</i>	sedimento marinho	Lavras, MG	RPB2	x
2529	<i>A. terreus</i>	sedimento marinho	CE	RPB2	x
2632	<i>A. nomius</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2700	<i>A. nomius</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2680	<i>A. amoenus</i>	solo da Mata Atlântica	LaBioMMi	RPB2	x
2643	<i>A. amoenus</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2692	<i>A. aff. amoenus</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2718	<i>A. cf. dimorphicus</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2720	<i>A. c.f. tubingensis</i>	areia da praia	Praia de Camburi, ES	RPB2	x
2708	<i>A. flavus</i>	solo de cultivo de algodão	Montividiu, GO	RPB2	
2722	<i>A. flavus</i>	contaminante da cultura CML 559	Lavras, MG	RPB2	x
2736	<i>A. flavus</i>	Planta seca de arnica	Belo Horizonte, MG		x
2947	<i>A. insulicola</i>	<i>Eudistoma vannei</i>	Fortaleza, CE	RPB2	x
2627	<i>A. welwitschiae</i>	sedimento marinho	CE	RPB2	x
2628	<i>A. welwitschiae</i>	sedimento marinho	CE	RPB2	x
2949	<i>A. welwitschiae</i>	sedimento marinho	Praia do Pecém, CE		x
2165	<i>A. fijiensis</i>	planta seca de arnica	Belo Horizonte MG	RPB2	x

Tabela 1, continuação

<b>CML</b>	<b>Espécie</b>	<b>Substrato</b>	<b>Local</b>	<b>Gene sequenciado</b>	<b>MALDI-TOF</b>
2734	<i>A. clavatus</i>	semente de soja	Ibiá, MG	RPB2	x
2735	<i>A. fijiensis</i>	Liteira de arnica	Belo Horizonte, MG	RPB2	x
2530	<i>A. cejpui</i>	sedimento marinho	Praia do Pecém, CE	RPB2	x
2531	<i>A. cejpui</i>	sedimento marinho	Praia do Pecém, CE		x
2737	<i>A. chevalieri</i>	semente de feijão	Lavras, MG	RPB2	x
2714	<i>A. sclerotiorum</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2631	<i>A. calidoustous</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
			Estação Ecológica de		
2728	<i>A. auratus</i>	solo da Mata Atlântica	Assis, SP	RPB2	x
2967	<i>A. sydowii</i>	Nd	Nd	RPB2	x
2968	<i>A. keveii</i>	Nd	Nd	RPB2	
2996	<i>Aspergillus</i> aff. <i>nutans</i>	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	
2999	<i>Aspergillus</i> aff. <i>nutans</i>	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	
3000	<i>Aspergillus</i> aff. <i>nutans</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual Ilha do Cardoso, SP	RPB2	
3002	<i>A. aff. raperi</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, SP	RPB2	

Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; LaBioMMi = Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil.

Nd: Desconhecido.

Tabela 2 Isolados do gênero *Penicillium* utilizados neste estudo.

<b>CML</b>	<b>Espécie</b>	<b>Subtrato</b>	<b>Local</b>	<b>Gene sequenciado</b>	<b>MALDI-TOF</b>
2703	<i>Penicillium steckii</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
240	<i>P. aff. raistrickii</i>	grão de café	Lavras, MG	RPB2	x
1226	<i>P. terrigenum</i>	solo de cultivo de algodão	Montividiu, GO	RPB2	x
1231	<i>P. wotroi</i>	solo do cerrado	Montividiu, GO	RPB2	x
2637	<i>P. brasilianum</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2691	<i>P. brasilianum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2693	<i>P. brasilianum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2689	<i>P. brasilianum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2695	<i>P. brasilianum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2688	<i>P. brasilianum</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2694	<i>P. brasilianum</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2528	<i>Penicillium</i> sp. 1	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2690	<i>Penicillium</i> sp. 1	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2696	<i>Penicillium</i> sp. 1	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2686	<i>P. multicolor</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
3014	<i>P. multicolor</i>	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	
3017	<i>P. multicolor</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, SP	RPB2	
2706	<i>P. daleae</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, SP	RPB2	x
2731	<i>P. daleae</i>	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	x
2732	<i>P. daleae</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP		x
2829	<i>P. daleae</i>	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	x
3013	<i>P. daleae</i>	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	
3025	<i>P. daleae</i>	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	

Tabela 2, continuação

<b>CML</b>	<b>Espécie</b>	<b>Subtrato</b>	<b>Local</b>	<b>Gene sequenciado</b>	<b>MALDI-TOF</b>
2715	<i>P. aff. miczynskii</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP		x
2730	<i>P. aff. miczynskii</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP	RPB2	x
2729	<i>P. westlingii</i>	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	x
2733	<i>P. westlingii</i>	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	x
2951	<i>P. westlingii</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, SP	RPB2	x
2716	<i>Penicillium</i> sp. 2	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	x
3022	<i>Penicillium</i> sp. 2	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	
1229	<i>P. aff. decaturense</i>	solo do cerrado	Montividiu, GO	RPB2	x
2705	<i>P. chrysogenum</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2527	<i>P. rubens</i>	sedimento de praia	Praia do Mucuripe, CE	RPB2	
3167	<i>P. digitatum</i>	<i>Citrus cinesis</i>	Lavras, MG	RPB2	
3021	<i>P. adametzi</i>	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	
3024	<i>Penicillium</i> sp. 3	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	
3011	<i>Penicillium</i> sp.4	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, SP	RPB2	
	<i>Penicillium</i> aff.				
3020	<i>herquei</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, SP	RPB2	
2828	<i>Penicillium</i> sp. 5	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP		x
2965	<i>P. flavigenum</i>	Nd	Nd	RPB2	x
2966	<i>P. chermesinum</i>	Nd	Nd		x
2725	<i>P. aff. janthinellum</i>	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	x
2726	<i>P. aff. janthinellum</i>	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	x

Tabela 2, continuação

<b>CML</b>	<b>Espécie</b>	<b>Subtrato</b>	<b>Local</b>	<b>Gene sequenciado</b>	<b>MALDI-TOF</b>
2727	<i>P. janthinellum</i>	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	x
2701	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2702	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2633	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2634	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2635	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2638	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2639	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2640	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2641	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2642	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2683	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2684	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2685	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2687	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2697	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2698	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2699	<i>P. citrinum</i>	Nd	LaBioMMi		x
2950	<i>P. citrinum</i>	sedimento marinho	Praia do Pecém, CE	RPB2	x

Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; LaBioMMi = Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil.

Nd: Desconhecido.



Tabela 3 Isolados do gênero *Talaromyces* utilizados neste estudo.

CML	Espécie	Subtrato	Local	Gene sequenciado	MALDI-TOF
395	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	solo	Benjamin Constant, AM	RPB2	x
2994	<i>T. amestolkiae</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, SP	RPB2	
2995	<i>T. amestolkiae</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual Ilha do Cardoso, SP	RPB2	
3019	<i>T. amestolkiae</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual Ilha do Cardoso, SP	RPB2	
2709	<i>T. amestolkiae</i>	liteira de <i>Clusia</i> sp. liteira de <i>Vismia</i>	Serra da Jibóia, BA	RPB2	x
2707	<i>T. amestolkiae</i>	<i>guianensis</i>	Serra da Ibiapaba, Ubajara-CE		x
1495	<i>T. amestolkiae</i>	Nd	UFMG, MG		x
2831	<i>T. amestolkiae</i>	liteira	Serra da Ibiapaba, Ubajara-CE	RPB2	x
3004	<i>T. thailandensis</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, SP	RPB2	
3005	<i>T. thailandensis</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, SP	RPB2	
3015	<i>T. c.f. thailandensis</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, SP	RPB2	
238	<i>T. ruber</i>	<i>Pinussp.</i>	Floresta S.A. Bayer Chemicals, Chile	RPB2	x
1452	<i>T. verruculosus</i>	Nd	UFMG, MG	RPB2	x
2717	<i>T. palmae</i>	solo da Mata Atlântica	Parque Estadual Carlos Botelho, SP	RPB2	x
2827	<i>Talaromyces</i> sp. 2	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	
2719	<i>T. minioluteus</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x

Tabela 3, continuação

<b>CML</b>	<b>Espécie</b>	<b>Subtrato</b>	<b>Local</b>	<b>Gene sequenciado</b>	<b>MALDI-TOF</b>
2830	<i>T. tratensis</i>	sedimento marinho	Praia do Pecém, CE	RPB2	x
3006	<i>Talaromyces</i> sp.1	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	
3007	<i>Talaromyces</i> sp.1	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	
1240	<i>T. purpurogenus</i>	solo	Montividiu, GO	RPB2	x
2644	<i>T. wortimannii</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2681	<i>T. wortimannii</i>	Nd	LaBioMMi	RPB2	x
2704	<i>T. aff.wortmannii</i>	fruto de maçã liteira de <i>Vismia</i>	LaBioMMi	RPB2	x
2710	<i>T. pinophilus</i>	<i>guianensis</i> liteira de <i>Vismia</i>	Mata Pau Ferro, PB		x
2711	<i>T. pinophilus</i>	<i>guianensis</i> liteira de <i>Vismia</i>	Serra da Jibóia, Santa Terezinha, BA	RPB2	x
2712	<i>T. pinophilus</i>	<i>guianensis</i> liteira de <i>Vismia</i>	Mata Pau-Ferro, PB		x
2713	<i>T. pinophilus</i>	<i>guianensis</i>	Serra da Ibiapaba, Ubajara, CE	RPB2	x
2826	<i>T. trachyspermus</i>	solo da Mata Atlântica	Estação Ecológica de Assis, SP	RPB2	

Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; LaBioMMi = Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil.

Nd: Desconhecido.

## APÊNDICE B

Tabela 4 Isolados de referência da região RPB2 utilizados na filogenia das espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*.

Gênero	Espécie	Código dos isolados de referência	Acesso GenBank para RPB2
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	NRRL 255	EF669628
<i>Aspergillus</i>	<i>A. terreus</i>	*NRRL 680	EF669660
<i>Aspergillus</i>	<i>A. terreus</i>	*NRRL 1913	EF669621
<i>Aspergillus</i>	<i>A. nomius</i>	NRRL 13137	EF661456
<i>Aspergillus</i>	<i>A. amoenus</i>	NRRL 4838	JN853824
<i>Aspergillus</i>	<i>A. dimorphicus</i>	NRRL 3650	EF652096
<i>Aspergillus</i>	<i>A. tubingensis</i>	NRRL4875	EF661055
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i>	*NRRL 1957	LC000581
<i>Aspergillus</i>	<i>A. insulicola</i>	NRRL 6138	EF661286
<i>Aspergillus</i>	<i>A. welwitschiae</i>	CBS 557.65	LC000572
<i>Aspergillus</i>	<i>A. fijiensis</i>	*CBS 119.49	HE984375
<i>Aspergillus</i>	<i>A. clavatus</i>	NRRL1	EF669730
<i>Aspergillus</i>	<i>A. cejpui</i>	CBS 157.66	JN121447
<i>Aspergillus</i>	<i>A. chevalieri</i>	NRRL 78	EF651954
<i>Aspergillus</i>	<i>A. sclerotiorum</i>	NRRL 415	EF661287
<i>Aspergillus</i>	<i>A. calidoustous</i>	*CBS 121611	JN121438
<i>Aspergillus</i>	<i>A. auratus</i>	NRRL 4378	EF669766
<i>Aspergillus</i>	<i>A. sydowii</i>	NRRL 250	EF652186
<i>Aspergillus</i>	<i>A. keveii</i>	*NRRL 1974	EF652168
<i>Aspergillus</i>	<i>A. nutans</i>	NRRL 4364	EF661227
<i>Aspergillus</i>	<i>A. raperi</i>	NRRL 2641	EF652190
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium steckii</i>	CBS 260.55	JN606602
<i>Penicillium</i>	<i>P. raistrickii</i>	CBS 261.33	JN406592
<i>Penicillium</i>	<i>P. terrigenum</i>	CBS 127354	JN606600
<i>Penicillium</i>	<i>P. wotroi</i>	CBS 118171	KF296460
<i>Penicillium</i>	<i>P. brasilianum</i>	CBS 253.55	KF296420
<i>Penicillium</i>	<i>P. multicolor</i>	CBS 501.73	EU427262
<i>Penicillium</i>	<i>P. daleae</i>	CBS 211.28	KF296427
<i>Penicillium</i>	<i>P. miczynskii</i>	CBS 220.28	JN606623
<i>Penicillium</i>	<i>P. westlingii</i>	CBS 231.28	JN606625
<i>Penicillium</i>	<i>P. decaturense</i>	CBS 117 509	JN606621
<i>Penicillium</i>	<i>P. chrysogenum</i>	*CBS 306.48	JX996596

Tabela 4, continuação

<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>	<b>Código dos isolados de referência</b>	<b>Acesso GenBank para RPB2</b>
<i>Penicillium</i>	<i>P. rubens</i>	*CBS 129667	KJ476430
<i>Penicillium</i>	<i>P. digitatum</i>	CBS 112082	JN121426
<i>Penicillium</i>	<i>P. adametzii</i>	CBS 209.28	JN121455
<i>Penicillium</i>	<i>P. herquei</i>	CBS 336.48	JN121494
<i>Penicillium</i>	<i>P. flavigenum</i>	*CBS 419.89	JX996676
<i>Penicillium</i>	<i>P. janthinellum</i>	CBS 340.48	JN121497
<i>Penicillium</i>	<i>P. citrinum</i>	*CBS 139.45	JN606604
<i>Talaromyces</i>	<i>T. amestolkiae</i>	CBS 132 696	JX315698
<i>Talaromyces</i>	<i>T. thailandensis</i>	CBS 133147	KM023307
<i>Talaromyces</i>	<i>T. ruber</i>	CBS 132704	JX315700
<i>Talaromyces</i>	<i>T. verruculosus</i>	CBS 388.48	KM023306
<i>Talaromyces</i>	<i>T. palmae</i>	CBS 442.88	KM023300
<i>Talaromyces</i>	<i>T. minioluteus</i>	CBS 642.78	JF417443
<i>Talaromyces</i>	<i>T. tratensis</i>	CBS 113. 146	KF984911
<i>Talaromyces</i>	<i>T. purpurogenus</i>	CBS 286.36	JX315709
<i>Talaromyces</i>	<i>T. wortimannii</i>	*CBS 391 48	KF196976
<i>Talaromyces</i>	<i>T. pinophilus</i>	CBS 631.66	KM023291
<i>Talaromyces</i>	<i>T. trachyspermus</i>	CBS 373.48	JF417432

Abreviações das coleções de culturas: NRRL = *National Centre for Agricultural Utilization Research*, Peoria, IL, EUA; CBS = *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Holanda.

\*Isolados de referência que não são isolados tipo.

## APÊNDICE C

Tabela 5 Características macromorfológicas das espécies de *Aspergillus* em diferentes meios de cultura incubados a 25 °C, com exceção do CYA 37 °C e sem fotoperíodo.

Espécie/isolado	Coloração da colônia						Diâmetro da colônia (mm)					
	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA
<i>A. terreus</i> (CML 2629, CML 2630)	Bege branco ao centro	Bege e branco, verso alaranjado	Bege verso bege alaranjado	Branco verso alaranjado	Branco	Bege com bordas brancas	39,6	38	48,3	60,3	24,3	35,6
<i>A. terreus</i> (CML 2948)	Bege com bordas brancas	Marrom claro bege ao centro verso marrom	Marrom claro, verso marrom escuro	Bege esbranqui- çado verso marrom amarelado	Bege e branco	Marrom claro bordas branco amarela- das	48	54,3	65	70	31	33,3

Tabela 5, continuação

Espécie/isolado	Coloração da colônia						Diâmetro da colônia (mm)					
	MEA	CYA	CYA	YES	CREA	OA	MEA	CYA	CYA	YES	CREA	OA
			37 °C						37 °C			
<i>A. terreus</i> (CML 2721)	Bege com bordas brancas	Marrom amarelado no centro, verso marrom amarelado	Marrom claro	Amarela- da marrom nas bordas verso alaranjado	Marrom claro	Marrom claro com bordas brancas	46,3	47,6	63	64,3	25,3	34,3
<i>A. sclerotiorum</i> (CML 2714)	Branco	Alaranjada ao centro e branca	Branca ao centro e amarelada	Branca	Branca	Branca	38,6	42,3	4,6	57	20	30
<i>A. dimorphicus</i> (CML 2718)	Branco acobreado	Branco	-	Branco	Branco amarela- do	Cobre e branco nas bordas	18,3	23	-	39	9,3	15
<i>A. flavus</i> (CML 2722)	Verde oliva	Verde oliva esbranqui- çado	Marrom, escleródios marrom escuro Verso bege	Verde oliva amarelado	Verde oliva claro	Verde oliva com bordas bege	57,6	60,3	60,3	70	37,6	45

Tabela 5, continuação

Espécie/isolado	Coloração da colônia						Diâmetro da colônia (mm)					
	MEA	CYA	CYA				MEA	CYA	CYA			
			37 °C	YES	CREA	OA			37 °C	YES	CREA	OA
<i>A. flavus</i> (CML 2736)	Verde oliva	Verde oliva amarronzado Verso róseo	Branco e marrom claro escleródios marrom escuro Branco	Verde oliva, bege e esbranquiçado verso amarelo	Verde oliva claro	Verde oliva esbranquiçado, borda bege	63	60,6	53	70	45	48,3
<i>A. clavatus</i> (CML 2734)	Branco esverdeado	Verde escuro com bordas brancas		Verde escuro com bordas brancas	Verde escuro com bordas brancas, verso amarelado	Verde escuro com bordas brancas	19	27,3	14,6	26,6	17,3	23
<i>A. fijiensis</i> (CML2735 e CML 2165)	Marrom escuro	Marrom escuro	-	Marrom escuro com bordas brancas	Marrom escuro com borda branca, verso amarelo	Marrom escuro	43,5	70	4	70	31,5	43

Tabela 5, continuação

Espécie/isolado	Coloração da colônia						Diâmetro da colônia (mm)					
	MEA	CYA	CYA 37 °C		CREA	OA	MEA	CYA	CYA 37 °C		CREA	OA
			YES	YES					YES	YES		
<i>A. welwitschiae</i> (CML2949, CML2627, CML2628)	Marrom escuro	Marrom escuro	Marrom escuro	Marrom escuro	Esporula- ção marrom escuro	Marrom escuro	51,8	64,4	63,3	70	38,4	48,3
<i>A. tuingensis</i> (CML 2720)	Marrom e branca	Branco com esporulação preta	Preta com escleró- dios rosa claro	Preta	Esporula- ção preta visível	Branco	38,6	66,6	63,3	63,3	55	44
<i>A. chevalieri</i> (CML 2737)	Amarela- do	Amarelo com bordas brancas	-	Cobre amarelado bordas brancas	-	Marrom claro com bordas brancas	7	13	-	35,3	-	5
<i>A. insulicola</i> (CML 2947)	Marrom dourado	Marrom claro com bordas bege	Marrom claro verso marrom com bordas alaranja- das	Marrom claro, bordas brancas Verso marrom escuro com borda alaranjada	Branco	Marrom claro	30,6	35,3	11,6	52	16,6	23,6

Tabela 5, continuação

Espécie/isolado	Coloração da colônia						Diâmetro da colônia (mm)					
	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA
<i>A. sydowii</i> (CML 2967)	Verde com bordas brancas	Verde com bordas brancas, verso marrom alaranjado	Marrom claro	Verde com bordas brancas, verso alaranjado	Verde com bordas brancas	Verde com bordas brancas	14,6	19,6	5	23,3	12	15
<i>A. keveii</i> (CML 2968)	Bege esverdeado	Marrom claro acinzentado, verso amarelado	-	Branco acinzentado, verso alaranjado	Branco	Branco acinzentado, verso esverdeado	10,3	22,3	-	23,6	13,3	24
<i>A. nutans</i> (CML 1996)	Rosa claro com bordas brancas	Rosa claro	-	Branco	-	Rosa claro	33	14	-	12	-	15

Tabela 6 Características macromorfológicas das espécies de *Penicillium* em diferentes meios de cultura incubados a 25 °C, com exceção do CYA 37 °C e sem fotoperíodo.

Espécie/isolado	Coloração da colônia						Diâmetro da colônia (mm)					
	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA
<i>P. aff. decaturense</i> (CML 1229)	Verde oliva ao centro, verde claro e branca nas bordas	Róseo ao centro, verde claro e branca Verso laranja	-	Branca Verso laranja	Branco amarelada	-	20	26,6	-	30,6	13,6	-
<i>P.wotroi</i> (CML 1231)	Verde, amarela com bordas brancas	Branca ao centro, amarela e verde com bordas brancas verso laranja	Branca	Rosa acinzentado ao centro, verde acinzentado com borda brancas verso amarelo	Amarela-da	-	49,6	42	21,3	44,3	21,6	-
<i>P. daleae</i> (CML 2706)	Marrom claro ao centro e bege	Branca verso amarelo	-	Branca verso amarelo ao centro e laranja	Branca	-	29,6	20	-	25	8,6	-
<i>P.flavigenum</i> (CML2965)	Verde ao centro e branca com tons amarelados	Verde ao centro com bordas branca amareladas verso amarelo	-	Verde azulada com bordas brancas verso amarelo alaranjado	-	-	25	21,5	-	34	-	-

Tabela 6, continuação

Espécie/isolado	Coloração da colônia						Diâmetro da colônia (mm)					
	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA
<i>P. chermesinum</i> (CML 2966)	Esverdeado com tons amarelados	Bege amarelado com bordas brancas verso amarelo alaranjado	acinzentado ao centro e verde claro	Bege esverdeado com bordas brancas verso laranja ao centro e amarelo	Branca amarelada	-	24	25	23	30	6	-
<i>P. multicolor</i> (CML3014)	Verde claro com bordas brancas	Verde ao centro e branca exudados amarelos Verso laranja ao centro e amarelo nas bordas	-	Verde acinzentado ao centro com tom azulado com bordas amareladas verso laranja com bordas amarelas	Branca amarelada	-	26,3	33,3	-	34,3	13,3	-
<i>P. adametzi</i> (CML 3021)	Verde claro acinzentado ao centro	Verde acinzentado e verso amarelo claro	-	Verde azulado com bordas brancas verso amarelo claro	Branca	-	28	21,3	-	25	7,3	-

Tabela 7 Características macromorfológicas das espécies de *Talaromyces* em diferentes meios de cultura incubados a 25 °C, com exceção do CYA 37 °C e sem fotoperíodo.

Espécie/isolado	Coloração da colônia						Diâmetro da colônia (mm)					
	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA
<i>T. amestolkiae</i> (CML 1495, CML 2994, CML 2995)	Verde pálido com bordas brancas	Rosa esverdeado ao centro e branca, verso avermelhado com bordas brancas	Róseo ao centro com bordas brancas	Amarelo e verde ao centro com bordas brancas verso vermelho amarronzado	Branco esverdeado	Verde com bordas brancas	43,8	27,6	10,8	28,5	18,5	32,1
<i>T. amestolkiae</i> (CML 2709)	Róseo esverdeado com bordas brancas	Róseo com bordas brancas verso marrom no centro e amarelado	Róseo ao centro com bordas verdes e brancas	Róseo ao centro e branco verso laranja pálido	Branco	Verde ao centro, róseo e branco nas bordas	36,3	31,3	11,3	25	19	30,6
<i>T. amestolkiae</i> (CML 2707)	Esverdeado	Rosa ao centro verde com bordas brancas, verso avermelhado com bordas brancas	Róseo ao centro com bordas verdes e brancas	Amarelo ao centro, verde com bordas brancas, verso avermelhado com bordas brancas	Branco	Verde com bordas brancas	39	30,3	11,3	25	19,3	27

Tabela 7, continuação

Espécie/isolado	Coloração da colônia						Diâmetro da colônia (mm)					
	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA
<i>T. amestolkiae</i> (CML 2831)	Róseo	Branco com bordas róseas verso branco alaranjado	Rosa claro	Róseo ao centro e branco verso laranja	Branco	Branco e às vezes róseo ao centro	32,6	18,6	8	20	19,6	38,6
<i>T. pinophilus</i> (CML 2711)	Verde amarelado	Verde amarelado com bordas brancas verso alaranjado	Branco	Verde amarelado com bordas brancas verso marrom alaranjado	Branco amare- lada	Verde escuro ao centro com bordas amarela- das	25,6	10	28,3	19,3	9	22,6
<i>T. thailandensis</i> (CML 3004)	Branca	Branca Verso róseo e branca	-	Branca verso alaranjado	Branca	Branca	28,6	21	-	22,3	5,6	18,3
<i>T. thailandensis</i> (CML 3005)	Amarela	Amarela com borda branca verso amarelo alaranjado	-	Rósea no centro e amarela, verso laranja amarelado	-	Rósea no centro e amarela	13,3	16	-	15,3	3,5	21,6

Tabela 7, continuação

Espécie/isolado	Coloração da colônia						Diâmetro da colônia (mm)					
	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA
<i>T. thailandensis</i> (CML 3015)	Amarela com bordas brancas	Rósea no centro amarela e branca, verso amarelo no centro e rosa	-	Rósea no centro e amarela verso laranja ao centro e amarelado	Branca	Amarela	24,3	21,3	-	22,3	8,6	24,3
<i>T. ruber</i> (CML238)	Verde oliva com bordas amareladas	Laranja ao centro, verde, rosa com bordas brancas, verso laranja avermelhado	Branco	-	Amarela- da	Verde oliva com bordas amarela- das	32	22	9,6	-	5	25
<i>T. purpurogenus</i> (CML 1240)	Verde oliva com bordas branco amareladas	Verde oliva ao centro laranja o amarelo e verde Verso vermelho	Rósea	Verde oliva ao centro escuro tons de verde azulado e rosa, borda alaranjada e branca verso laranja	Amarela	Verde oliva com bordas amarelo esverdea das	21,6	21	6,3	20,6	6	16,6

Tabela 7, continuação

Espécie/isolado	Coloração da colônia						Diâmetro da colônia (mm)					
	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA	MEA	CYA	CYA 37 °C	YES	CREA	OA
<i>T. cf. verruculosus</i> (CML 1452)	Verde claro ao centro e amarelada	Branco ao centro com tons esverdeado verso avermelhado	Róseo acinzentado com bordas brancas	Branco ao centro verde amarelado com bordas brancas verso avermelhado	Amarelo esverdeada	Verde claro ao centro e amarelado	26,3	24,3	25,3	21,6	9,6	29,3
<i>T. palmae</i> (CML 2717)	Amarela ao centro e verde oliva bordas brancas	Amarela ao centro e verde oliva bordas brancas verso amarelo	-	Amarela ao centro e verde oliva bordas amareladas verso amarelo	Amarela-da	Verde oliva com borda branca	23,3	21	-	22,3	7,3	14,3
<i>T. minioluteus</i> (CML 2719)	Verde amarronzado com borda branca	Verde oliva com borda branca	-	Branca e verde oliva verso laranja com borda amarela	Branca	Marrom	12,6	11,3	-	12,3	2,3	11,3
<i>T. tratensis</i> (CML 2830)	Amarela ao centro e verde oliva com borda branca	Amarela ao centro e branco verso amarelo	-	Verde azulado ao centro e branca verso amarelado	-	Amarela ao centro com bordas brancas	10,6	9,6	-	9,3	2,5	7

Tabela 8 Características micromorfológicas das espécies de *Aspergillus* em meio cultura MEA incubados a 25 °C.

<b>Espécie/ isolado</b>	<b>Estipe (µm)</b>	<b>Formato da vesícula</b>	<b>Tamanho da vesícula (µm)</b>	<b>Séries</b>	<b>Formato do conídio</b>	<b>Tamanho do conídio (µm)</b>	<b>Fonte da descrição</b>
<i>A. terreus</i> (CML 2629)	6,3-7	globosa	15, 9 -16,3	Bisseriado	globoso	2,2-2,4	Klich, 2002
<i>A. sclerotiorum</i> (CML 2714)	8,1-10	piriforme	20-22,6	Bisseriado	globoso	2,7-3,0	Klich, 2002
<i>A. dimorphicus</i> (CML 2718)	22,6 -25	globosa	34,1-36	Bisseriado	globoso	3,0-4,0	Samson et al., 2014
<i>A. tubingensis</i> (CML 2718)	10,7- 11,3	globosa	35,3 - 42,2	Bisseriado	globoso	3,5 -5	Klich, 2002, Varga et al., 2007
<i>A. welwitschiae</i> (CML2627)	13-13,7	globosa	58,6-67,3	Bisseriado	globoso	3,5 -4,0	Henn. apud Wehmer, 1907 Hong et al., 2013
<i>A. fijiensis</i> (CML 2165)	9- 11	elipsoidal	55-65	Unisseriado	elipsoidal	3,4 x 4 – 3,5 x 4	Varga et al., 2011
<i>A. flavus</i> (CML 2722)	9,3 -12	globosa	26,7 -35	Unisseriado	globoso	3,2-3,6	Klich, 2002
<i>A. clavatus</i> (CML 2734)	15-30	piriforme	66-72	Unisseriado	elipsoidal	3,0 x 2,5- 3,5x 2,5	Klich, 2002

Tabela 9 Características micromorfológicas das espécies de *Penicillium* em meio cultura MEA incubados a 25 °C.

<b>Espécie/isolado</b>	<b>Estipe (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Ramificação do conidióforo</b>	<b>Nº de métulas</b>	<b>Formato do conídio</b>	<b>Tamanho do conídio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Fonte da descrição</b>
<i>P. raistrickii</i> (CML 240)	297	Biverticilado	3-5	Globoso	2	Pitt, 2000
<i>P. chrysogenum</i> (CML 2705)	200 -268	Terverticilado	3-5	Subgloboso	2,5-3,0	Pitt, 2000
<i>P. digitatum</i> (CML 3164)	74-75	Terverticilado a biverticilado	3	Elipsoidal	6 x2,5	Pitt, 2000
<i>P. brasilianum</i> (CML 2688)	8- 11	Monoverticilado	2-3	Elipsoidal	3,2-4,4 x 4,5	Batista,1957
<i>P. multicolor</i> (CML 2686)	169,3	Monoverticilado	2-4	Elipsoidal	2,5 x 3,0	Rivera e Seifert, 2011; Pitt, 2000
<i>P. citrinum</i> (CML 2950)	105	Terverticilado a quarternverticilado	3-5	Globoso	2,5	Houbraken et al., 2011
<i>P. steckii</i> (CML 2703)	100	Terverticilado	3-6	Elipsoidal/ fusiforme	2.3 -2,7 x 2,0-2,5	Houbraken e Samsom, 2011

Tabela 10 Características micromorfológicas das espécies de *Talaromyces* em meio cultura MEA incubados a 25 °C.

<b>Espécie/isolado</b>	<b>Estipe (µm)</b>	<b>Ramificação do conidióforo</b>	<b>Nº de métulas</b>	<b>Formato do conídio</b>	<b>Tamanho do conídio (µm)</b>	<b>Fonte da descrição</b>
<i>T. amestolkiae</i> (CML 2709)	92,5- 97	Biverticilado	3-6	elipsoidal	2 -2,5× 1.5–2.0	Yilmaz et al., 2014
<i>T. ruber</i>	121 -135	Biverticilado	3-6	elipsoidal	2,5 –3,0 × 1,5–1,7	Yilmaz et al., 2014
<i>T. pinophilus</i> (CML 2710)	59,4 - 80	Biverticilado	3-6	globoso- subgloboso	2-2,5	Samson et al.,2011 Yilmaz et al., 2012
<i>T. tratensis</i> (CML 2830)	125–215	Biverticilado	3-6	elipsoidal	2.0–2.3 × 3.0–3,2	Yilmaz et al., 2014
<i>T. wortmannii</i> (CML 2644)	100–140	Biverticilado	3- 6	elipsoidal	2,5-3,0x 1,5-3,7	Yilmaz et al., 2014
<i>T. minioluteus</i> (CML 2719)	80-83	Biverticilado	3-6	elipsoidal	2.5–4 × 1.5–1,7	Yilmaz et al., 2014