

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

TAXONOMIA DE ESPÉCIES DE *Penicillium* (sensu lato) RECLASSIFICADAS COMO
Talaromyces spp. ISOLADAS DE PLANTIOS DE SISAL (*Agave sisalana*) NO
SEMIÁRIDO DA BAHIA

MARIA LUÍZA DO CARMO SANTOS

CRUZ DAS ALMAS
BAHIA - BRASIL
2016

MARIA LUÍZA DO CARMO SANTOS

TAXONOMIA DE ESPÉCIES DE *Penicillium* (sensu lato) RECLASSIFICADAS COMO
Talaromyces spp. ISOLADAS DE PLANTIOS DE SISAL (*Agave sisalana*) NO
SEMIÁRIDO DA BAHIA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia, como parte das
exigências do Curso de Graduação de
Bacharelado em Biologia, para obtenção
do título de Bacharel em Biologia.

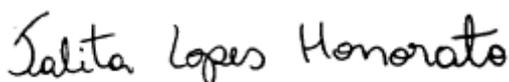
CRUZ DAS ALMAS
BAHIA - BRASIL
2016

MARIA LUÍZA DO CARMO SANTOS

TAXONOMIA DE ESPÉCIES DE *Penicillium* (sensu lato) RECLASSIFICADAS COMO
Talaromyces spp. ISOLADAS DE PLANTIOS DE SISAL (*Agave sisalana*) NO
SEMIÁRIDO DA BAHIA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia, como parte das
exigências do Curso de Graduação de
Bacharelado em Biologia, para obtenção
do título de Bacharel em Biologia.

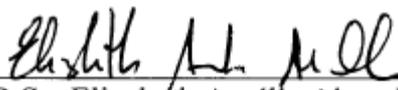
APROVADO: 28 de julho de 2016



D. Sc. Talita Lopes Honorato
UFRB-CCAAB



M.Sc. Caroline Lopes Damasceno
UEFS



D.Sc. Elizabeth Amélia Alves Duarte
Co-orientadora
UFRB-CCAAB

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Lúcia e Francisco, meus exemplos de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida e por todas as bênçãos concebidas.

Aos meus pais pela paciência, cuidado, dedicação, amor incondicional e por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao meu namorado, Francis, por estar presente em todos os momentos, me fortalecendo.

À todos da minha família (Silveira, Roseno e Carmo), que sempre estiveram comigo, torcendo pelo meu sucesso.

À Mariana, Laísa, Gabriela, Marcela, Maiara, Isabela, Tainah e Ivina, pelos anos de amizade verdadeira.

Às minhas mãezinhas do coração (Tia Norma e Tia Anair), pelo zelo – vocês são especiais.

Aos meus colegas de profissão e amigos, Patrícia, Rosiane, Paulo e Tiago, por fazer minha graduação ainda melhor.

À minha orientadora Dr^a. Ana Cristina Fermino, por todo suporte necessário para o desenvolvimento das pesquisas. À minha também orientadora Dr^a Elizabeth Amélia, pelos ensinamentos diários, pela paciência, pelo incentivo e por toda dedicação.

À Eliane Candeias (Lica), por ter me acolhido em seus trabalhos e por todo conhecimento compartilhado ao longo desse período.

A todos do Laboratório de Microbiologia da UFRB, em especial Carol, Cristiane Duarte, Thiago Oliveira, Marcelly, Lorena, Zozilene Teles (Lene), Josilda Damasceno, Vanessa, Antônia, por todo auxílio. Ao professor Dr. José Luiz Bezerra, por nos presentear com seu conhecimento e humildade em nosso convívio diário.

A todos os professores do curso de Biologia Bacharelado, pelos ensinamentos fundamentais à minha formação.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia por oportunizar a realização do Curso.

À CAPES/PIBIC pela concessão das bolsas.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização desse sonho. Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	viii
REVISÃO TEÓRICA	x
Sisal (<i>Agave sisalana</i>)	x
Fungos rizosféricos	x
Fungos endofíticos	xi
<i>Penicillium</i> sensu lato	xii
REFERÊNCIAS	xiv

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colônias cultivadas em meio MEA à 25 °C durante sete dias. Espécies de <i>Talaromyces</i> e <i>Penicillium</i> , verso e reverso. A- <i>Talaromyces pinophilus</i> B- <i>Talaromyces minioluteus</i> ; C- <i>Talaromyces albobiverticillius</i> ; D- <i>Talaromyces atroroseus</i> ; E- <i>Penicillium steckii</i> ; F- <i>Penicillium citrinum</i> ; G- <i>Penicillium singorense</i> ; H- <i>Talaromyces sayulitensis</i> ; I- <i>Penicillium simplicissimum</i> ; J- <i>Talaromyces allahabadensis</i> ; K- <i>Penicillium adametzii</i> ; L- <i>Talaromyces muroii</i> ; M- <i>Penicillium oligosporum</i> ; N- <i>Penicillium charlesii</i>	5
Figura 2. Produção de exsudatos (A e B) e mudança de coloração em meio de cultura MEA (C). A- <i>Talaromyces albobiverticillius</i> ; B- <i>Talaromyces atroroseus</i> ; C- <i>Talaromyces muroii</i>	6
Figura 3. Representação das espécies de <i>Penicillium</i> sensu lato de acordo com os locais de coleta (tecido da planta e o solo rizosférico).....	8
Figura 4. Filogenia de <i>Penicillium</i> sensu lato a partir da região ITS. Incluindo os isolados dos diferentes tecidos e solo rizosférico e espécies tipo (ex tipo) depositadas GenBank.....	9
Figura 5. Filogenia de <i>Penicillium</i> sensu lato a partir da região BenA. Incluindo os isolados dos diferentes tecidos e solo rizosférico e espécies tipo (ex tipo) depositadas GenBank.....	11

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação de <i>Penicillium</i> sensu lato de solo rizosférico e tecidos vegetais de sisal cultivado em Conceição do Coité, BA.....	7
Tabela 2. Revisão da classificação do gênero <i>Talaromyces</i> considerando a morfologia de anamorfos e teleomorfos e a classificação mais recente de único nome com suporte de análise polifásica (morfológica e molecular).....	15

RESUMO

SANTOS, MARIA LUÍZA, Bacharela em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, julho de 2016. TAXONOMIA DE ESPÉCIES DE *Penicillium* (sensu lato) RECLASSIFICADAS COMO *Talaromyces* spp. ISOLADAS DE PLANTIOS DE SISAL (*Agave sisalana*) NO SEMIÁRIDO DA BAHIA. Orientadora: D.Sc. Ana Cristina Fermino Soares. Co-orientadora: D.Sc. Elizabeth Amélia Alves Duarte

A Bahia ocupa o primeiro lugar em produção nacional de fibra de sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm), gerando emprego e renda aos pequenos agricultores do semiárido. No entanto, a podridão vermelha, causada pelo *Aspergillus niger* tem causado declínio na produção de fibra de sisal. E por ser uma cultura robusta, sem manejo e tratamentos culturais, o controle biológico é a alternativa viável desde que selecionados micro-organismos antagonistas ao patógeno. Visto que *Penicillium* sensu lato é um grupo amplo grupo de fungos que habita diversos ambientes e apresentam aporte biotecnológico, sobretudo antagonista, este trabalho objetivou isolar e identificar espécies de *Penicillium* sensu lato de solo rizosférico e endofíticos a partir de cultivos de sisal em Conceição do Coité, que é um dos principais produtores de sisal no semiárido da Bahia. Isolados com características macroscópicas de *Penicillium* sensu lato foram repicados em meio MEA objetivando observar, em placa cor, forma e liberação de extratos característicos desse grupo, os quais foram confirmados por ampliações das regiões ITS e β -tubulina que são reportadas como *barcode* na identificação de *Penicillium* sensu lato. Foram obtidos 49 isolados de *Penicillium* sensu lato, incluindo representantes dos grupos *Talaromyces* e *Penicillium*, sendo que algumas espécies como *Talaromyces pinophilus* e *Penicillium citrinum* foram isolados tanto dos tecidos como na rizosfera associada a cultura de sisal. As espécies de *Penicillium* sensu lato isoladas e identificadas indicam que a cultura de sisal está associada a diferentes espécies desse grupo, sendo primeiro relato para este hospedeiro e alvos interessantes para estudos futuros explorando seus potenciais biotecnológicos.

Palavras chave: Fungos endofíticos, rizosfera, diversidade

ABSTRACT

SANTOS, MARIA LUÍZA, Bachelor of Biology, Federal University of Bahia Reconcavo, July 2016. *Penicillium* SPECIES TAXONOMY (sensu lato) CLASSIFIED AS *Talaromyces* spp. ISOLATED SISAL PLANTATIONS (*Agave sisalana*) SEMIARID IN BAHIA Advisor D.Sc. Ana Cristina Fermino Soares. Co-Advisor: D.Sc. Elizabeth Amélia Alves Duarte

Bahia ranks first in domestic production of sisal fiber (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm), generating jobs and income to small farmers in the semiarid region. However, the red rot caused by *Aspergillus niger* has caused a decline in sisal fiber production. And a robust culture without management and cultural practices, biological control is a viable alternative since selected microorganisms antagonistic to the pathogen. Since sensu *Penicillium* is a broad group of fungi inhabiting different environments and feature biotech supply, especially antagonistic, this study aimed to isolate and identify species sensu *Penicillium* of rhizosphere and endophytes from sisal crops in Conceição do Coité which is one of the leading sisal producers in the semiarid region of Bahia. Isolates with macroscopic characteristics sensu lato *Penicillium* were subcultured on half MEA aiming observed, color plate shape and release characteristics extrolitos this group, which were confirmed by amplification of regions of ITS and β -tubulin are reported as a barcode on the identification of sensu *Penicillium*. They were obtained 49 isolates of *Penicillium* broad sense, including representatives of *Talaromyces* and *Penicillium* groups, and some species such as *Talaromyces pinophilus* and *Penicillium citrinum* were isolated both tissues as in the rhizosphere associated with sisal culture. The sensu *Penicillium* species isolated and identified indicate that the sisal culture is associated with different species of this group, being first report for this host and interesting targets for future studies exploring its potential biotechnology.

Key-words: Endophytic fungi, rhizosphere, diversity

INTRODUÇÃO

O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) é uma planta originada da Península do Yucatã, México (GENTRY, 1982), introduzida no Brasil em meados de 1903 nos municípios da Bahia, Madre de Deus e Maragogipe (SECTI, 2007). Atualmente, o sisal é cultivado em 20 municípios da Bahia, sendo Conceição do Coité um dos principais produtores (JESUS JUNIOR, 2015). Essa cultura adaptou-se muito bem a região do semiárido do Nordeste (ABREU, 2010). Nesta região as condições edafoclimáticas desfavorecem o desenvolvimento de outras culturas, sendo assim, o sisal é a melhor alternativa de fonte de renda para a população local (SEAGRI, 2012). A partir das fibras de sisal são gerados produtos e subprodutos que, de forma direta e indireta, contribuem para a economia da região (ALVES; SANTIAGO & LIMA, 2005).

Os plantios de sisal da Bahia estão ameaçados pela podridão vermelha, doença causada pelo *Aspergillus niger* v. Tieghem que tem ocasionado perdas de até 75% na produção de fibra (COUTINHO *et al.*, 2006; ABREU, 2010). É um patógeno facultativo que necessita de lesões de origem mecânica ou fisiológica para causar a infecção no hospedeiro (LIMA *et al.*, 1998). Quanto a comunidade microbiota presente nessa cultura, tem-se poucas informações. Portanto, esses micro-organismos pouco explorados podem muitas vezes apresentar grande potencial de interesse biotecnológico (MOREIRA *et al.*, 2009). Os fungos filamentosos são alvos interessantes na produção de enzimas e metabólitos, como antibióticos, ácidos orgânicos e pigmentos (PUNT *et al.*, 2002; ABREU; ROVIDA & PAMPHILE, 2015).

Estes fungos são micro-organismos multicelulares, eucariotos, com parede celular rígida e realizam a nutrição através da absorção (TORTORA, 2010), estando presentes no solo, folhedos, água doce e salgada, em plantas, animais, estrumes, alimentos, resquícios de plantas e animais, no homem, e em diversos ambientes (DIX, 1995). Assim, nesses locais há uma interação direta ou indireta de fungos e outros organismos com elementos químicos e/ou físicos (DIX, 1995; MAIA, 1998). A presença de fungos nos ecossistemas é essencial, pois esses apresentam funções importantes para a manutenção, atuando como saprófitos, parasitas de plantas, animais e até mesmo outros fungos ou em simbiose com variados tipos de plantas (METTING, 1993; SYLVIA *et al.*, 1998).

Dos fungos isolados de solo, as espécies de *Penicillium* sensu lato são comumente registradas neste ambiente (SAMSON; FRISVAD, 2004). Esses micro-organismos, na sua maioria são saprófitos, pouco exigentes quanto a sua nutrição, crescendo em ambientes com concentrações mínimas de sais ou inúmeras fontes de carbono, facilitando sua colonização

nos mais diversos ambientes (PITT, 1991).

Penicillium sensu lato abrange quatro subgêneros, *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Penicillium* e *Biverticillium*, classificado por Pitt (1980). O *Biverticillium* é um dos subgêneros mais bem caracterizado dentro do *Penicillium* sensu lato, possuindo 23 espécies aceitas por Pitt (1979).

Houbraken & Samson (2011) e Samson *et al.* (2011), redefiniram algumas espécies de *Penicillium* do subgênero *Biverticillium* em *Talaromyces*, filogeneticamente resolvido em um clado monofilético, que se distinguiu de outros subgêneros de *Penicillium*. Além disso, *Biverticillium* possui espécies bem distinguíveis dos outros grupos de *Penicillium*, por apresentarem estruturas como conidióforos distintos biverticilados simétricos (PITT, 1979; PITT & HOCKING, 1997; SAMSON *et al.* 2011). Algumas espécies são conhecidas como produtoras de enzimas e pigmentos com potenciais biotecnológicos (REYES *et al.* 1999; NARIKAWA *et al.* 2000; YILMAZ *et al.* 2012; GAO, *et al.* 2013).

Penicillium sensu lato é um grupo com bastante espécies descritas, porém a identificação taxonômica é complexa, por apresentar alta variabilidade interespecífica genética e fenotípica. Motivo pelo qual os estudos de muitas espécies do gênero são realizados pela soma de técnicas de identificação taxonômica clássica e avançada (SAMSON; FRISVAD, 2004; VISAGIE, 2014).

Sabendo que *Penicillium* sensu lato apresenta grande diversidade e que algumas espécies já são reportadas com potenciais biotecnológicos como antagonismo. O isolamento e identificação de *Penicillium* sensu lato associados a cultura de sisal é importante no estudo de diversidade desse grupo associado ao sisal e na seleção de micro-organismos com potencial de biocontrole da podridão vermelha do sisal. Adicionalmente, espécies endofíticas podem ser aplicadas como indutores de crescimento e uso benéfico para a cultura.

REVISÃO TEÓRICA

Sisal (*Agave sisalana*)

A planta *Agave sisalana* Perrine ex Engelm conhecida popularmente como agave ou sisal pertence à família *Agavaceae*, que possui em torno de 480 espécies e são distribuídas em regiões tropicais e subtropicais onde o clima é caracteristicamente seco (ABDEL-GAWAD *et al.*, 1999). O sisal é uma planta originada da Península do Yucatã, México (GENTRY, 1982), foi introduzida no Brasil no ano de 1903 em Madre de Deus e Maragogipe, municípios do estado da Bahia, porém somente no ano de 1939 as experimentações com a cultura no campo se firmaram (SECTI, 2007). A cultura adaptou-se muito bem a região do semiárido do nordeste onde as condições edafoclimáticas limitam o cultivo sem tratamentos culturais, irrigação e sistema de sombreamento, por exemplo (ABREU, 2010; SEAGRI, 2015; DIAS, *et al.*, 2015).

A. sisalana é uma planta monocotiledônea, que a partir das suas folhas se extrai fibras duras e grossas. Essas fibras são utilizadas na fabricação de variados produtos, em que aproximadamente 60% da produção mundial são destinadas a fabricação de barbantes (JESUS JUNIOR, 2015). Na Bahia, 60% do destino das fibras são utilizadas para a produção de fios e cordas. Essas fibras são aproveitadas de diversas formas, por muitas regiões, como por exemplo, para fabricação de tapetes e capachos; mantas de sisal para produção de estofados e sela de montaria; no artesanato, bolsas, descansadores de panelas, porta material didático, entre outras produções (SILVA, 1999).

O Brasil é o país que mais produz e exporta fibras de sisal mundialmente, sendo que 96,4% de toda produção nacional é proveniente do estado da Bahia. (IBGE, 2015). No ano de 2014 a produção correspondeu cerca de 138 mil toneladas de fibras, com exportação de 66,2 mil toneladas, gerando divisas de US\$ 123,9 milhões (CONAB, 2015).

No entanto, tem-se observado um decréscimo na produção dessa cultura no semiárido baiano, devido à podridão vermelha, patologia causada pelo fungo *Aspergillus niger*, que ocasiona reduções médias variando de 5% a 35% da produção (ABREU, 2010). Esta doença acontece em todos os estágios de desenvolvimento da cultura e o progresso desta enfermidade acarreta na morte e tombamento da planta (ABREU, 2010).

Fungos rizosféricos

A rizosfera foi definida por Silveira (2007) como a região do solo que interage diretamente com as raízes, proporcionando a proliferação de micro-organismos. Os fungos encontrados no solo rizosférico podem estimular a planta a desenvolver mecanismos de

tolerância ao estresse abióticos e bióticos contribuindo também para um acréscimo da biomassa (SMITH, 2008; BEVER, 2010). Neste local também a comunidade de micro-organismos presente é consideravelmente maior do que no solo livre de raízes (PELCZAR, 1981), pois as raízes proporcionam substratos que estes organismos requerem para sua propagação (MELO & AZEVEDO, 2008; CANOVA, 2009).

Das espécies de fungos isoladas do solo, as pertencentes ao grupo *Penicillium* sensu lato são bastante comuns, funcionando na natureza como micro-organismos excelentes na decomposição de matéria orgânica (SAMSON; FRISVAD, 2004). Tais fungos possuem características que proporcionam a colonização nos diversos ambientes, com concentrações mínimas de sais ou inúmeras fontes de carbono (PITT, 1991).

No Brasil houveram registros de fungos filamentosos isolados da rizosfera de diferentes culturas como girassol, cana-de-açúcar e tomateiro (CAVALCANTI *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 1989; SILVA *et al.*, 1990). No entanto, ainda não se conhecem estudos com fungos filamentosos isolados da cultura de sisal. Esses micro-organismos presentes na rizosfera podem ser benéficos ou não à planta, sendo os fungos muito estudados devido ao seu possível potencial biotecnológico, possibilitando assim a descoberta de possíveis controladores biológicos de fitopatógenos (FERREIRA, 2008).

Fungos endofíticos

Os micro-organismos endofíticos foram conceituados primeiramente por De Bary (1866), que os considerou como os micro-organismos que habitam o interior de tecidos vegetais. Azevedo (1998) conceituou esses organismos como fungos e bactérias que vivem no interior de plantas, habitando regiões aéreas, como folhas e caules, sem causar prejuízos aparentes. Ainda, Azevedo & Araújo (2007) definiram esse grupo de organismos como os que estão no interior de tecidos de plantas, sem provocar sintomas aos seus hospedeiros e com potencial ou não de crescer em meio de cultura.

Dentre os micro-organismos endofíticos, os fungos filamentosos são os mais frequentemente isolados (GUNATILAKA, 2006). Os fungos endofíticos em sua maioria fazem parte do filo Ascomycota e seus anamorfos (Hyphomycetes e Coelomycetes). As espécies de Basidiomycota são pouco representadas como endofíticos (SCHULZ & BOYLE, 2005). A partir de 1970, os estudos com fungos endofíticos foram acentuados visando seu emprego como agentes de controle biológico, despertando também interesse na indústria farmacêutica (NALINI *et al.*, 2014; AMIN *et al.*, 2014). Fungos endofíticos podem produzir compostos químicos (como metabólicos secundários) que podem agir como antifúngicos,

antibacterianos, imunossupressores e anti-neoplásicos (WANG, 2011).

O *Penicillium* sensu lato é encontrado com frequência no isolamento de endofíticos associados a variados vegetais. Em alguns estudos realizados com esse grupo de micro-organismos, foram identificadas espécies em culturas de café, cana-de-açúcar e em folhas, raízes e frutos de *Melia azedarach* (amargoseira), *Musa acuminata* (bananeira) (CAO; YOU; ZHOU, 2002; SANTOS *et al.*, 2003; STUART, 2006; VEGA *et al.*, 2008).

4.4 *Penicillium* sensu lato

Link (1809) nomeou o gênero como *Penicillium*, vindo do Latim *Penicillius*, pois havia percebido que esses micro-organismos apresentavam conidióforos em forma de pincel e descreveu três espécies *P. candidum*, *P. glaucum* e *P. expansum*, sendo a última definida por Thom, em 1910, espécie tipo do gênero (RAPER & THOM, 1949). De acordo com Alexopoulos *et al.* (1996), o gênero *Penicillium*, é formado somente por espécies anamorfas, cujo Filo é Ascomycota, Classe Plectomucetes, Ordem Eurotiales e Família Trichomaceae. No entanto, essa classificação foi redefinida através de estudos filogenéticos, dividindo a Trichomaceae em três famílias: Aspergillaceae, Thermoascaceae e Trichocomaceae (HOUBRAKEN; SANSOM, 2011).

Penicillium sensu lato abrange quatro subgêneros, *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Penicillium* e *Biverticillium*, classificado por Pitt (1980).

Os estudos com sequenciamento de DNA iniciaram-se a partir de 1990, e passaram a representar uma técnica importante para os taxonomistas, pois proporcionaram pesquisas com maior especificidade (VISAGIE *et al.*, 2014). Ainda, segundo Visagie *et al.*, (2014), tal metodologia permite melhor comparação entre as espécies e suas relações, oportunizando a identificação por meio dessas sequências ou como complemento da identificação por taxonomia clássica.

Penicillium sensu lato é um amplo grupo, que apresenta diversidade de espécies descritas e a taxonomia complexa, pois possui grande variedade interespecífica em seus caracteres morfológicos. Por isso muitos estudos atuais são realizados com a soma da taxonomia clássica e avançados, utilizando estruturas reprodutivas visualizadas através da microscopia eletrônica e ferramentas moleculares, na identificação desses fungos (SAMSON & FRISVAD, 2004; VISAGIE, 2014).

As espécies de *Penicillium* possuem características que favorecem a sua colonização em várias plantas por crescerem em condições de elevadas temperaturas e pouca disponibilidade de água (MOSS, 1991; CARDOSO FILHO *et al.*, 2011).

O *Biverticillium* é um dos subgêneros mais bem definido de *Penicillium* sensu lato, que possui 23 espécies aceitas por Pitt (1979). As espécies pertencentes a esse subgênero possuem estruturas morfológicas facilmente distinguíveis dos demais grupos, como conidióforos biverticilados simétricos (PITT, 1979; PITT & HOCKING, 1997; SAMSON *et al.* 2011). No entanto, há muitas semelhanças na morfologia interespecíficas, o que dificulta a distinção dessas espécies, por isso características em colônias desses fungos, como micélios pigmentados e exsudatos solúveis, já foram muito utilizados como critério de identificação.

Espécies de *Penicillium* do subgênero *Biverticillium* são filogeneticamente agrupados em um clado monofilético ao gênero *Talaromyces* (HOUBRAKEN & SAMSON, 2011; SAMSON *et al.* 2011). Esse subgênero era dividido de acordo com o estágio sexual em que os fungos se apresentavam, sendo nomeados nos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces*. No entanto com o advento de estudos filogenéticos percebeu-se que ambos gêneros formavam um grupo monofilético. Assim, uma recente mudança para único nome na nomenclatura de fungos foi concomitante à aceitação das espécies de *Penicillium* do subgênero *Biverticillium* reclassificadas apenas como *Talaromyces*, deixando de separar as formas anamorfas das teleomorfas (SAMSON *et al.* 2011).

Talaromyces é um gênero importante, por possuir espécies com potenciais biotecnológicos, como capacidade de produzir enzimas e pigmentos solúveis, como *T. rugulosus* produtores de fosfatase (REYES *et al.*, 1999, NARIKAWA *et al.*, 2000), *T. pinophilus* produtores de endoglucanase e celulase (POL *et al.* 2012) e *T. cellulolyticus* (*Acremonium cellulolyticus* = *T. pinophilus*), que possui relatos como fungo que degrada celulose, utilizado na degradação de biomassa (FUJII *et al.*, 2013, HOUBRAKEN; VRIES R. P. DE; SAMSON, R.A., 2014).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GAWAD, M. M.; EL-SAYED, M. M.; ABDEL-HAMEED, E. S. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. **Fitoterapia**, 70, 371-381, 1999.
- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Uningá Review**. 21, 55-59, 2015.
- ABREU, K. C. L. M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no estado da Bahia**. 2010. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia). Cruz das Almas – BA, 2010.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York, John Wiley. 1996.
- ALVES, M. O.; SANTIAGO, E. G.; LIMA, A. R. M. Diagnóstico socioeconômico do setor sisaleiro do Nordeste Brasileiro. **Série Documentos do ETENE**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2005.
- AMIN, N.; SALAM, M.; JUNAID, M. *et al.* Isolation and characterization of endophytic fungi from rice. **International Journal Current Microbiology and Applied Sciences** 3, 459-67, 2014.
- AZEVEDO, J. L. Microorganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 117-137, 1998.
- AZEVEDO, J. L. & ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli BN, Deshmukh SK (eds.) **Fungi: multifaceted microbes**. CRC Press, Boca Raton, 189-207, 2007.
- BEVER, J. D.; DICKIE, I.A.; FACELLI, E. *et al.* Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. **Trends in Ecology & Evolution**. 25, 468-478, 2010.
- CANOVA, S. P. **Diversidade e Bioprospecção de Actinobactérias Isoladas de Manguezais**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- CAO, L. X.; YOU, J. L.; ZHOU, S. N. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, 18, 169-171, 2002.
- CARDOSO FILHO, F. C.; CALVET, R. M.; PEREYRA, C. M. *et al.* Ocorrência de *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e aflatoxinas em amostras de farinha de milho utilizadas no consumo humano, Piauí, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, 78 (3), 443-447, 2011.
- CAVALCANTI, M. A. & MAIA, L. C. Cellulolytic fungi isolated from alluvial soil in semi-arid area of the northeast of Brazil. **Revista de Microbiologia**. 25, 251-254, 1994.

CONAB. (Companhia Nacional de Abastecimento).(2015). Sisal 2015 Retrospectiva. Available in: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/sisal__conjuntura_especial_retrospectiva_2015-1.pdf. Acesso em 25 de março, 2016.

COUTINHO, W. M.; LUZ, C. H.; SUASSUNA, N. D.; SILVA, O. R. R. F. *et al.* A podridão do tronco do sisal. Campina Grande: Embrapa Algodão. (**Comunicado Técnico, 281**), 4, 2006.

DE BARY, A. **Morphologie und Physiologie Pilze, Flechten, und myxomyceten.** Hofmeister's Handbook of Physiological Botany. Vol. 2. Leipzig, 1866.

DIAS, A. B.; CUNHA, A. L.; DA SILVA, A. O. *et al.* Potencial De Indicação Geográfica Do Sisal Na Bahia. **Cadernos de Prospecção.** 8 (1), 174, 2015.

DIX, N. J.; WEBSTER, J. **Fungal Ecology.** Chapman & Hall, London. 594, 1995.

FERREIRA, A. **Interação entre bactérias endofíticas e do rizoplane com Eucalyptus.** Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 77, 2008.

FUJII, T.; HOSHINO, T.; INOUE, H. *et al.* Taxonomic revision of the cellulose degrading fungus *Acremonium cellulolyticum* nomen nudum to *Talaromyces* based on phylogenetic analysis. **FEMS Microbiology Letters.** 351, 32–41, 2013.

GAO, H.; ZHOU, L.; LI, D. *et al.* New cytotoxic metabolites from the marine derived fungus *Penicillium* sp. **Helvetica Chimica Acta.** 96, 514–519, 2013.

GENTRY, H. S. **Agaves of continental North America.** University of Arizona Press, Tucson, 1982.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products,** Cincinnati, 69, 509-526, 2006.

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in Applied Microbiology.** 86, 199–249, 2014.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies in Mycology.** 70, 1–51, 2011.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro. 29, 1-83, 2015.

JESUS JUNIOR, L. A. **Árvore do conhecimento: Território sisal. Agência Embrapa de informação tecnológica.** Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_sisal/arvore/CONT000fckg3dhd02wx5eo0a2ndxy195m7ip.html. Acesso em 17 de agosto de 2015.

LIMA, G.; DE CUTIS F.; CASTORIA R. *et al.* Additives and natural products against postharvest pathogens and compatibility with antagonistic yeasts. **Journal of Plant Pathology**, 80, 259, 1998.

LINK. **Letters in applied microbiology**. 35, 272-275, 1809.

MAIA, L. C. Diversidade de fungos e líquens e sucessão fúngica na Reserva Ecológica de Dois Irmãos. In **Reserva Ecológica de Dois Irmãos: estudos em uma remanescente de Mata Atlântica em área urbana (Recife-Pernambuco-Brasil)** (I.C., Machado, A.V., Lopes & K.C. Pôrto, coords). Governo do Estado de Pernambuco, Editora da UFPE, Recife, 83-113, 1998.

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 647, 2008.

METTING, B. F. **Soil microbial ecology**. Marcel Dekker, New York, 1993.

MOREIRA, G. M.; PEREIRA, V. M.; MENDES – COSTA, M. C. Diversidade de fungos endofíticos associados a mamona (*Ricinus communis* L.), **Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil**, São Lourenço – MG, 13 a 17 de Setembro de 2009.

MOSS, M. O. Mycology of cereal grain and cereal products. In: CHELKOWSKI In:CHELKOWSKI, J. (Ed.). **Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage**. Amsterdam: Elsevier, 1991.

NALINI, M. S.; SUNAYANA, N. & PRAKASH, H. S. Endophytic Fungal Diversity in Medicinal Plants of Western Ghats, India. **International Journal of Biodiversity** Volume, Article ID 494213, 9, 2014.

NARIKAWA, T.; SHINOYAMA, H.; FUJII, T. A â-rutinosidase from *Penicillium rugulosum* IFO 7242 that is a peculiar flavonoid glycosidase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 64, 1317–1319, 2000.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: MacGraw-Hill Ltda, 2, 1981.

PITT, J. I. & HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**, 2nd edn. Blackie Academic and Professional, London, 1997.

PITT, J. I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. Academic Press Inc., London, England, 1980.

PITT, J. I. **A laboratory Guide to Common *Penicillium* Species**. North Wales: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing, 1991.

PITT, J. I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. Academic Press Inc, London, 1979.

- POL, D.; LAXMAN, R. S.; RAO, M. Purification and biochemical characterization of endoglucanase from *Penicillium pinophilum* MS 20. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**. 49, 189–194, 2012.
- PUNT, P. J.; BIEZEN, N. V.; CONESA, A. *et al.* Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. **Trends Biotechnol.** 20, 200–206, 2002.
- RAPER, K. B., THOM, C. *A manual of the Penicillia*. Baltimore, Williams and Wilkins. 1949.
- REYES, I.; BERNIER, L.; SIMARD, R. R. *et al.* Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV induced mutants. **FEMS Microbiology Ecology**. 28, 291–295, 1999.
- SAMSON, R. A.; YILMAZ, N.; HOUBRAKEN, J.; SPIERENBURG, H.; SEIFERT, K. A. *et al.* Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**. 70, 159–183, 2011.
- SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: new Taxonomic Schemes Mycotoxins and Other Extralites. **Studies in Mycology** 49, 1-260, 2004.
- SANTOS, A. C.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S. Fungos isolados da rizosfera da cana-de-açúcar da Zona da Mata de Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica** 12, 23-29, 1989.
- SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES-FO, E.; ROCHA, W. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Endophytic fungi from *Melia azedarach*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford v. 19, 767-770, 2003.
- SCHULZ, B., BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research** 109(06), 661-686, 2005.
- Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Reforma Agrária, Pesca e Aquicultura-SEAGRI. **Estiagem prolongada atinge duramente produção de sisal em 2013**. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/noticias>. Acesso em: 25 de março de 2015.
- Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Reforma Agrária, Pesca e Aquicultura – SEAGRI. **Pesquisa aponta solução para a podridão vermelha do sisal**. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/noticias>. Acesso em: 25 de março de 2015.
- SECTI - SECRETARIA DE CIÊNCIA TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. Plano de Desenvolvimento do APL De Sisal da Bahia: **relatório técnico**. Governo do Estado da Bahia, Salvador, 2, 2007.
- SILVA, M. I. L.; CAVALCANTI, M. A. Q.; LIMA, D. M. M. Fungos da rizosfera de sementeiras de tomate. **Fitopatologia Brasileira**. 15(4), 323-326, 1990.
- SILVA, O. R. R. F.; BELTRÃO, N. E. de M. (Org.). **Agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPA, 205, 1999.
- SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S.S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 79, 2007.

SMITH, S. E.; READ, D. J. Mycorrhizal symbiosis. 3^a ed., San Diego, **Academic Press**, 787, 2008.

STUART, R. M. **Comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SYLVIA, D. M. Micorrhizal symbioses. In: SYLVIA, D.M.; FUHRMANN, J.J.; HARTEL, P.G.; ZUBERER, D.A. (Ed.). **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, 408-426, 1998.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed. 4, 330-339, 2010.

VEGA, F. E. Insect pathology and fungal endophytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 98, 277-279, 2008.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C., *et al.* Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**. 78, 343–371, 2014.

WANG, L. W.; ZHANG, Y. L.; LIN, F. C. *et al.* Natural products with antitumor activity from endophytic fungi. **Mini- Reviews in Medicinal Chemistry**. 11, 1056 –1074, 2011.

YILMAZ, N.; HOUBRAKEN, J.; HOEKSTRA, E. S. *et al.* Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. **Persoonia**. 29, 39–54, 2012.

ÍNDICE

Artigo

<i>Título: Penicillium sensu lato</i> isolados de rizosfera e tecidos de sisal <i>Agave sisalana</i> no semiárido da Bahia	1
Resumo	1
Introdução	2
Material e métodos	3
Resultados	5
Discussão	12
Conclusões	16
Referências	16

Penicillium sensu lato isolados de rizosfera e tecidos de sisal *Agave sisalana* no semiárido da
Bahia

Maria Luiza do Carmo SANTOS¹

Elizabeth Amélia Alves DUARTE*,

Eliane Leal CANDEIAS¹,

Thiago Alves Santos de OLIVEIRA¹,

Ana Cristina Fermino SOARES¹

¹ CCAAB – Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brazil

Running title: New species of *Talaromyces* in *Agave Sisalana*

* *Correspondence and Proofs should be sent to:*

Dra. Elizabeth Amélia Alves Duarte

CCAAB – Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas

UFRB – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Rua Rui Barbosa, 710, Centro

Cruz das Almas-BA, 44380-000, BRAZIL

phone: +55 (75) 3621 9359

e-mail: elizabethaad@gmail.com

Resumo

Penicillium sensu lato é um grupo amplo com espécies que habitam os mais diversos ambientes. A identificação desses fungos, isolados de diferentes ambientes é muito importante para o conhecimento desse grupo. Desse modo, este estudo visou isolar e identificar as espécies de *Penicillium* sensu lato associados à cultura de sisal. A partir de técnicas de isolamentos de endofíticos e de diluição seriada, foi possível obter 49 estirpes de fungos pertencentes ao *Penicillium* sensu lato, estando entre eles o gênero recentemente reclassificado em *Talaromyces*. Através da identificação utilizando comparações de regiões de ITS e BenA, foram identificadas 14 espécies distintas, *Talaromyces pinophilus*; *Talaromyces minioluteus*; *Talaromyces albobiverticillius*; *Talaromyces atroroseus*; *Penicillium steckii*; *Penicillium citrinum*; *Penicillium singorense*; *Talaromyces sayulitensis*; *Penicillium simplicissimum*; *Talaromyces allahabadensis*; *Penicillium adametzii*; *Talaromyces muroii*; *Penicillium oligosporum*; *Penicillium charlesii*. Este trabalho proporcionou o conhecimento das espécies de *Penicillium* que colonizam e estão relacionadas à cultura do sisal, gerando informações importantes que podem contribuir no entendimento da interação destes micro-organismos com a planta hospedeira.

Introdução

Os fungos do gênero *Penicillium* são bastante estudados há muitas décadas. O interesse por tal gênero é explicado devido ao grande número de espécies patogênicas à uma gama de hospedeiros e por apresentarem características ecológicas de sobrevivência em diferentes habitats, além de serem decompositores de matéria orgânica (PITT 1980, PITT 1991, FRISVAD e SAMSON 2004, SAMSON *et al.* 2010).

Estudos taxonômicos com abordagem polifásica (morfológica, fisiológica e filogenética) tem reorganizado espécies de *Penicillium* sensu lato, conceito atualmente aceito, para os quatro subgêneros: *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Penicillium* e *Biverticillium* adotado por Pitt, (1980). Considerando os estudos com os gêneros anamórficos e telomórficos estudados separadamente e, portanto, distintamente nomeados os gêneros teleomorfos associados a *Penicillium* sensu lato são *Talaromyces* e *Eupenicillium* (este último atualmente é sinônimo de *Penicillium* stricto sensu (HOUBRAKEN e SAMSON 2011; YILMAZ *et al.*, 2014). De forma particular o subgênero *Biverticillium* taxonomicamente diferente dos demais subgêneros foi estudado e agrupado em um clado monofiletico com o anamorfo *Talaromyces* (LOBUGLIO *et al.*, 1993; PITT *et al.* 2000; SAMSON *et al.*, 2011). Assim, *Talaromyces* é o nome adotado para *Penicillium* subg. *Biverticillium* seguindo a reclassificação taxonômica dos grupos a partir de estudos filogenéticos multi genes (SAMSON *et al.*, 2011; MCNEILL *et al.* 2012; YILMAZ *et al.*, 2014; YILMAZ *et al.*, 2016).

Em estudos da micobiota de sisal (*Agave sisalana*) no semiárido da Bahia é numerosa a quantidade de isolados de *Penicillium* sensu lato da rizosfera e tecidos da planta sem sintomas da principal doença da cultura, a podridão vermelha do sisal causada por *Aspergillus niger* seção nigri. Inclusive, dois isolados foram reportados como agente antagonista a este fitopatógeno (CANDEIAS *et al.*, 2016). Contudo, a pouca variabilidade interespecífica deste grupo de fungos é fator limitante na identificação morfológica, sobretudo devido ao grande número de espécies descritas (SAMSON; FRISVAD, 2004).

Destarte, neste trabalho foram isolados fungos de solo rizosférico e tecidos de sisal de uma área produtora no semiárido da Bahia, Brasil. A pré-seleção de representantes do gênero *Penicillium* sensu lato, especialmente *Talaromyces* foi feita com base nos estudos atuais sobre este grupo de fungos com abordagem filogenética multi genes. Portanto, neste estudo o princípio “um fungo um nome” foi aplicado (HAWKSWORTH *et al.*, 2011; NORVELL, 2011), com relato inédito de *Talaromyces* spp. associadas ao sisal.

Material e métodos

Material biológico (coletas)

As coletas de tecidos de plantas de sisal (*Agave sisalana*) sem sintomas de podridão vermelha do sisal, assim como de solo rizosférico foram realizadas no município de Conceição do Coité, Bahia. As amostras foram coletadas pelo método de caminhamento em “W” em uma fazenda no mês de março de 2014.

Isolamento de fungos a partir de solo rizosférico de sisal

Em cada área de plantio de sisal foram selecionadas 10 plantas equidistantes para coleta de 2 Kg de solo rizosférico do horizonte A (0 – 20 cm). O solo foi peneirado e armazenado em saco plástico estéril sob refrigeração.

Foi utilizada a técnica de diluição seriada baseada no método de Clark (1965) para isolar os fungos. Em Erlenmeyer com capacidade para 250 mL foi adicionado 10 g de solo rizosférico e 90 mL de solução salina (NaCl a 0,85%) esterilizada que foram incubados em agitador orbital a 12000 rpm por 20 minutos. Em seguida foram realizadas diluições decimais em série (1:10), em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina esterilizada, para obtenções das diluições de 10^{-1} a 10^{-4} . Sucedendo com o plaqueamento de 100 μ L das diluições 10^{-2} a 10^{-4} em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), acrescido 100 μ g/mL de Cloranfenicol para inibição do crescimento de bactérias (LACAZ *et al.* 1991) e em triplicata. As placas foram incubadas por três dias a 28 ± 2 °C em B.O.D para o crescimento dos fungos.

Após o crescimento dos fungos nas placas incubadas, foram realizados sucessivos plaqueamentos, assim cada isolado foi repicado para novas placas de Petri contendo meio BDA e incubadas a 28 ± 2 °C durante 10 dias e observados o crescimento fúngico.

Isolamento de fungos endofíticos de tecidos de sisal

As amostras coletadas de tecidos (caules, folhas e raízes) de sisal (*A. sisalana*) foram desinfestadas superficialmente para a eliminação de possíveis micro-organismos epifíticos. Posteriormente, os tecidos foram cortados em pequenos fragmentos de 1,5 cm e desinfestados com álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, novamente em álcool 70% por 1 minuto e duas lavagens em água destilada estéril, cada uma por 30 segundos.

Os fragmentos dos tecidos foram plaqueados independentemente (seis fragmentos por placa) em meio de cultura BDA, acrescido do antibiótico Cloranfenicol a 100 mg/L e

incubados a 28 °C por até 15 dias (COLLADO *et al.*, 1996). Após o surgimento das hifas dos fungos circundantes aos fragmentos dos tecidos, foram repicadas as colônias de todos os isolados para novas placas contendo BDA. Após a purificação, as culturas foram incubadas a 28 °C ± 2 para crescimento durante 10 dias.

Crescimento seletivo dos isolados de *Penicillium* sensu lato

A partir de análises macroscópicas dos aspectos do micélio aéreo, coloração da colônia (verso e reverso), forma, odor e o desenvolvimento durante 10 dias de incubação a 28 ± 2 °C em meio BDA foram selecionados prováveis isolados pertencentes ao gênero *Penicillium*. Estes isolados foram então plaqueados em meio MEA (Ágar Extrato de Malte), incubados durante 7 dias a 25 °C conforme descrito por SAMSON *et al.*, (2010).

Extração de DNA, Amplificação por PCR e Sequenciamento

A extração de DNA dos isolados foi feita a partir de colônias com 2 semanas de cultivo em meio MEA com o kit de isolamento de DNA microbiano Ultraclean™ (Mobio, Solana Beach, EUA), seguindo recomendações do fabricante. A integridade e a quantidade do DNA foi verificada usando eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio visualizado sobre luz ultravioleta, seguida da fotodocumentação.

As reações de PCR foram preparadas como descrito por Houbraken & Samson (2011). Para as amplificações das regiões ITS-28S (Internal Transcribed Spacers) do DNA ribossomal foram utilizados os *primers* ITS1 e ITS4 descritos por WHITE *et al.* (1990). Para β -tubulina (BenA) foram utilizados os *primers* Bt2a e Bt2b descritos por GLASS & DONALDSON (1995). As reações foram preparadas com os seguintes reagentes e concentrações: 60 ng de DNA de cada amostra; 1x de tampão da enzima Taq DNA polimerase; 3,7 mM de MgCl₂; 0,6 pmol/μL de dNTPs; 0,4 pmol/μL de cada primer; 2,5 U de Taq DNA polimerase, com volume final ajustado para 50 μL com água ultrapura. Foi incluído o controle negativo, substituindo o DNA por água ultrapura. Os ciclos de amplificações foram realizados no Veriti Thermal Cycler PCR (Applied Biosystems) sob as condições térmicas indicadas para ambos os primers.

Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio e visualizados sobre luz ultravioleta, seguida da fotodocumentação. Em seguida estes fragmentos foram cortados do gel para purificação utilizando o Kit Illustra® GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences) para posterior identificação nucleotídica utilizando o sequenciador automático ABI-

Prism 3500 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*) da empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA.

Analise dos dados

A edição e montagem das sequências foram realizadas com o programa Sequencher 4.1.4 (Gene Code Corporation). O programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) foi usado para comparar as sequências de cada isolado com aquelas encontradas em bancos de dados públicos, incluindo espécies tipo que foram incluídas nas análises filogenéticas.

O conjunto de dados analisados foi alinhado utilizando o MEGA versão 6.06 (TAMURA *et al.*, 2013). O modelo adequado para a gerar as árvores filogenéticas foi determinado pelo MEGA através do Bayesian Information Criterion (BIC). As análises Maximum-likelihood (ML) foram executadas calculando inicialmente Bio- Neighbour-Joining (BioNJ), seguido com a opção Nearest-Neighbour-Interchange (NNI).

Resultados

Isolamentos e cultivo de *Penicillium* sensu lato

A partir dos isolamentos realizados do solo rizosférico e de tecidos vegetais foram selecionados 49 isolados com características macroscópicas de colônias crescidas em meio MEA do grupo *Penicillium* sensu lato. Os diferentes aspectos entre as espécies de isolados selecionados (crescimento e coloração miceliais) podem ser observados na figura 1. Colônias com características divergentes às deste grupo não estão incluídos neste trabalho.

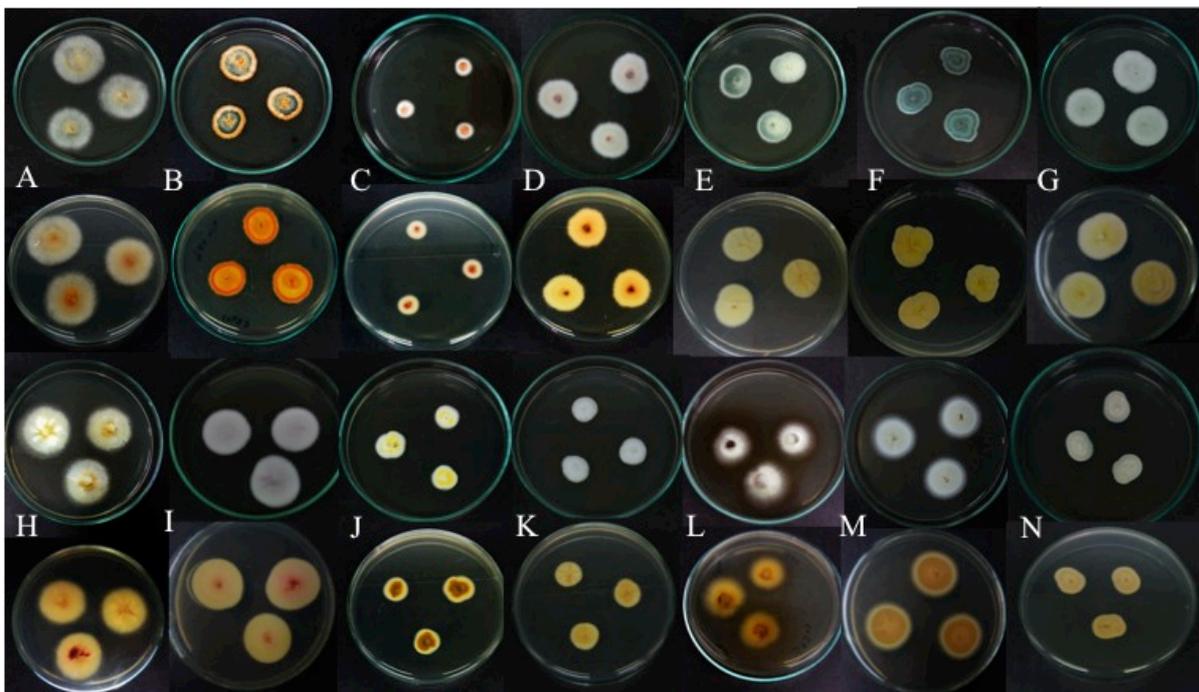


Figura 1. Colônias cultivadas em meio MEA à 25 °C durante sete dias. Espécies de *Talaromyces* e *Penicillium*, verso e reverso. A- *Talaromyces pinophilus* B- *Talaromyces minioluteus*; C- *Talaromyces albobiverticillius*; D- *Talaromyces atroroseus*; E- *Penicillium steckii*; F- *Penicillium citrinum*; G- *Penicillium singorense*; H- *Talaromyces sayulitensis*; I- *Penicillium simplicissimum*; J- *Talaromyces allahabadensis*; K- *Penicillium adametzii*; L- *Talaromyces muroii*; M - *Penicillium oligosporum*; N- *Penicillium charlesii*.

O cultivo dos isolados obtidos em meio MEA à 25 °C durante sete dias demonstrou características, como a produção de exsudatos e mudança na coloração do meio (pigmentação avermelhada), nas colônias de três espécies de fungos (Figura 2). Essas características apresentadas não foram presentes no cultivo das outras espécies isoladas, o que não descarta a possibilidade, visto que são utilizados também outros meios de cultura para observação dessas peculiaridades.

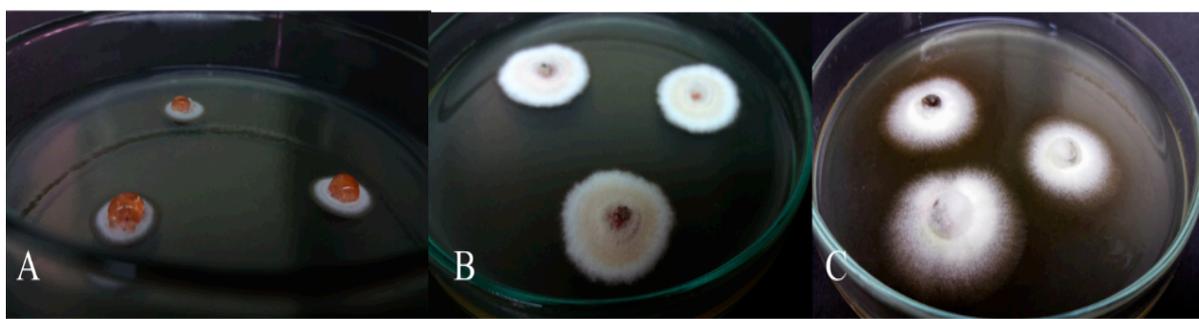


Figura 2. Produção de exsudatos (A e B) e mudança de coloração do meio de cultura MEA (C). A- *Talaromyces albobiverticillius*; B- *Talaromyces atroroseus*; C- *Talaromyces muroii*

Identificação molecular e filogenia de *Penicillium* sensu lato

A partir de estudos de sequências obtidas das regiões ITS e BenA foi possível definir relações filogenéticas no grupo *Penicillium* sensu lato com representatividade de espécies biverticiladas recentemente nomeados *Talaromyces* (Tabela 1). Este é o primeiro estudo deste grupo de fungos isolados de solo rizosférico e tecidos de sisal (*Agave sisalana*) coletados no semiárido da Bahia, Brasil. Portanto, pioneiro a adotar um único nome para espécies, seja sexuada ou assexuada, conforme sugere o Código Internacional de Nomenclatura para as algas, fungos e plantas (MCNEILL *et al.*, 2012). O alinhamento das sequências geradas neste estudo com sequências tipo do grupo *Penicillium* sensu lato foi suportada pela recente classificação filogenética proposta por SAMSON *et al.* (2011); MCNEILL *et al.* (2012); YILMAZ *et al.* (2014); YILMAZ *et al.* (2016).

Tabela 1. Identificação de *Penicillium* sensu lato de solo rizosférico e tecidos vegetais de sisal cultivado em Conceição do Coité, BA.

Isolado	Taxonomia ¹	Número de acesso no GenBank ²	
		ITS	BenA
C602, F140, R21, R31, R35, R25, S248, S95, S250, S265, S15	<i>Penicillium citrinum</i>	AF033422	GU944545
R144, S231	<i>Penicillium singorense</i>	KJ775674	KJ775167
R15, S208	<i>Penicillium simplicissimum</i>	GU981588	GU981632
C21	<i>Penicillium steckii</i>	GU944597	GU944522
S122	<i>Penicillium adametzii</i>	JN714929	JN625957
S204	<i>Penicillium oligosporum</i>	KC411752	KF296466
S249	<i>Penicillium charlesii</i>	AF033400	JX091508
C18, F23, F1, R18, R123, R1, R104, S115, S275, S153, S271, S258, S12, S129	<i>Talaromyces pinophilus</i>	JN899382	JX091381
C29, F37, S502, 2151, S257, S24	<i>Talaromyces minioluteus</i>	JN899346	KF114799
C39, R27	<i>Talaromyces atroroseus</i>	KF114747	KF114789
R43, R137	<i>Talaromyces sayulitensis</i>	KJ775713	KJ775206
S32	<i>Talaromyces allahabadensis</i>	KF984873	KF984614
C27, F93, S28	<i>Talaromyces albobiverticillius</i>	HQ605705	KF114778
C93	<i>Talaromyces muroii</i>	JN899351	KJ865727

Os códigos representam o local de coleta: S = solo rizosférico; R = raiz; C = caule e F = folha.

¹Os amplicons foram sequenciados em ambas as orientações e os fragmentos de consulta apresentados correspondem à sequência obtida com 'e-values' iguais a zero. ²Números de acesso que correspondem às sequências descritivas (espécies tipo) da taxonomia indicada na coluna anterior.

Dos isolados obtidos de raiz (13), caule (6), folha (5) e rizosfera (25), foram identificadas espécies em comum nas diferentes fontes de isolamento, representado no diagrama de Venn (VENN, 1880) na figura 3, pelas interseções das circunferências. Assim, *T. pinophilus* e *P. citrinum* são as espécies representativas, pois considerando a associação dessas espécies na cultura de sisal, essas colonizam todos os tecidos da planta assim como o solo que está diretamente relacionado a ela.

As espécies endofíticas de folha e caule isoladas (*Talaromyces muroii*, *Talaromyces albobiverticillius*, *Talaromyces atroroseus*, *Talaromyces minioluteus*, *Talaromyces pinophilus*, *Penicillium steckii* e *Penicillium citrinum*), são as que serão estudadas mais à fundo em trabalhos futuros à fim da utilização dessas espécies explorando o seu potencial antagonista ao *A. niger*.

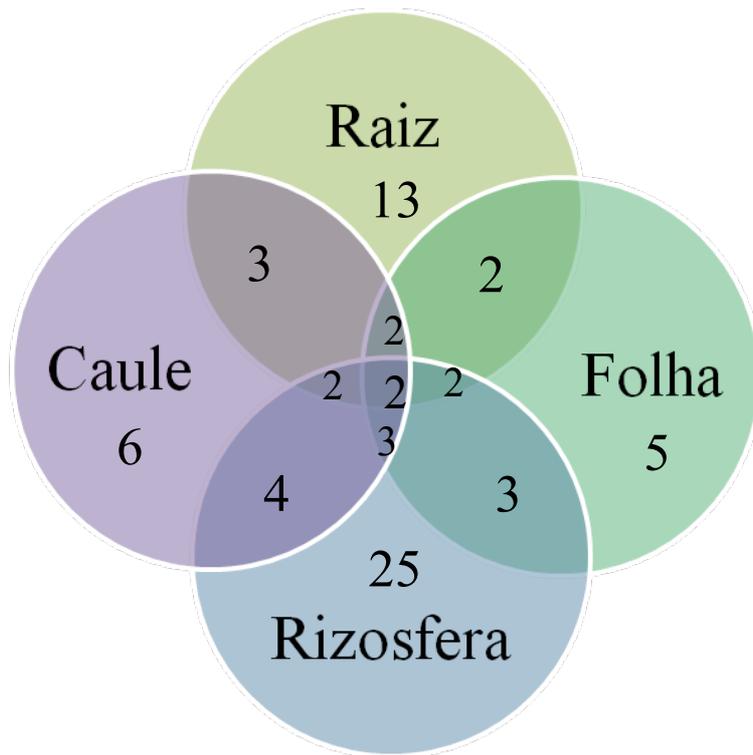


Figura 3. Representação das espécies de *Penicillium* sensu lato de acordo com os locais de coleta (tecido da planta e o solo rizosférico).

A filogenia foi realizada na inclusão das estirpes isoladas nas respectivas espécies identificadas a partir do alinhamento com sequências *ex-tipo* e outras também disponíveis no NCBI (Genbank). Foi possível observar que os isolados de *Talaromyces* sp. formam clado monofilético com as outras com as espécies de *Penicillium* comportados pelo complexo *Penicillium* sensu lato.

O alinhamento do conjunto de dados ITS foi de 345 bp de comprimento e incluiu 36 estirpes. A análise ML (Maximum-likelihood), foi realizada com o modelo mais adequado, o K2 + G+I (Figura 4).

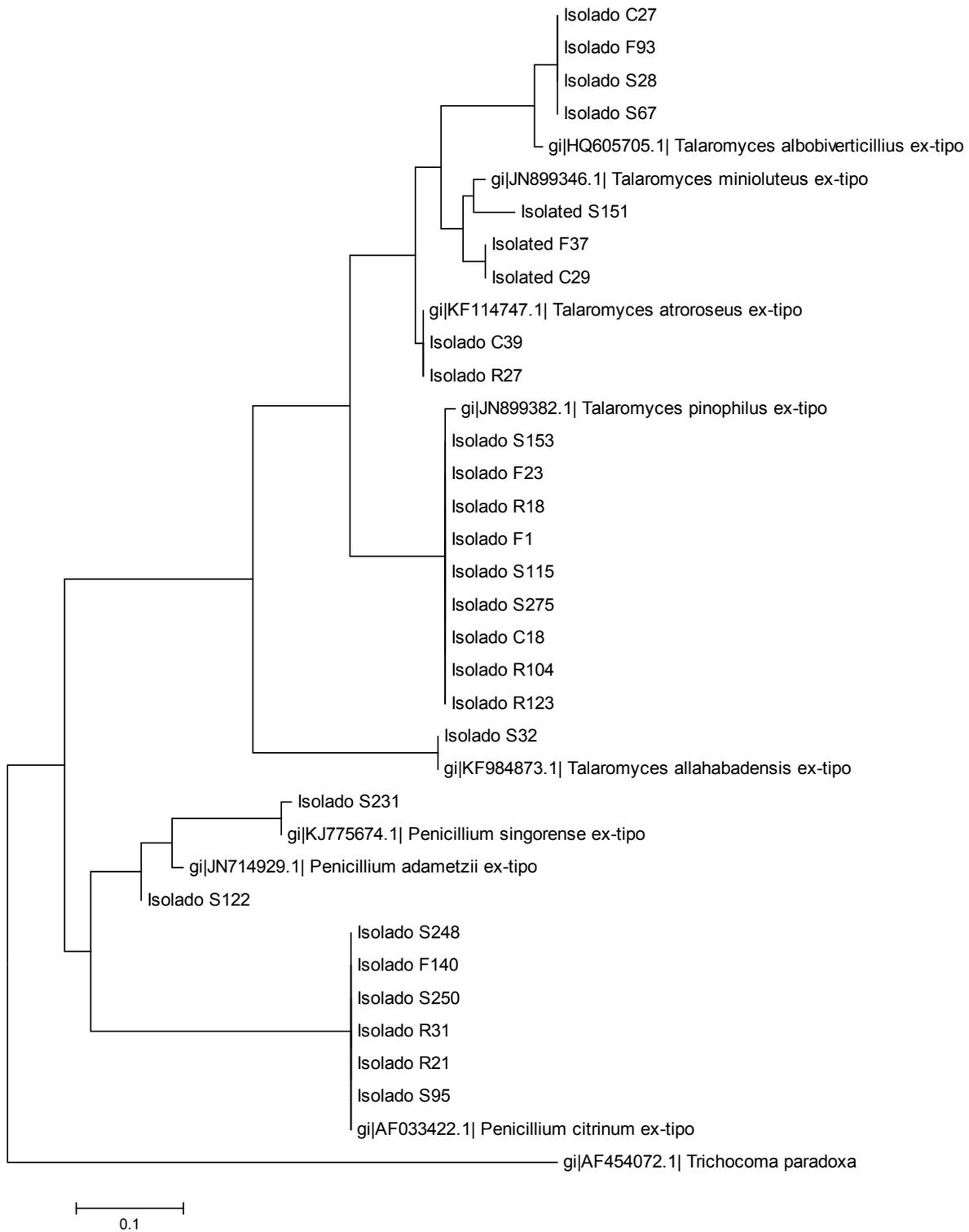
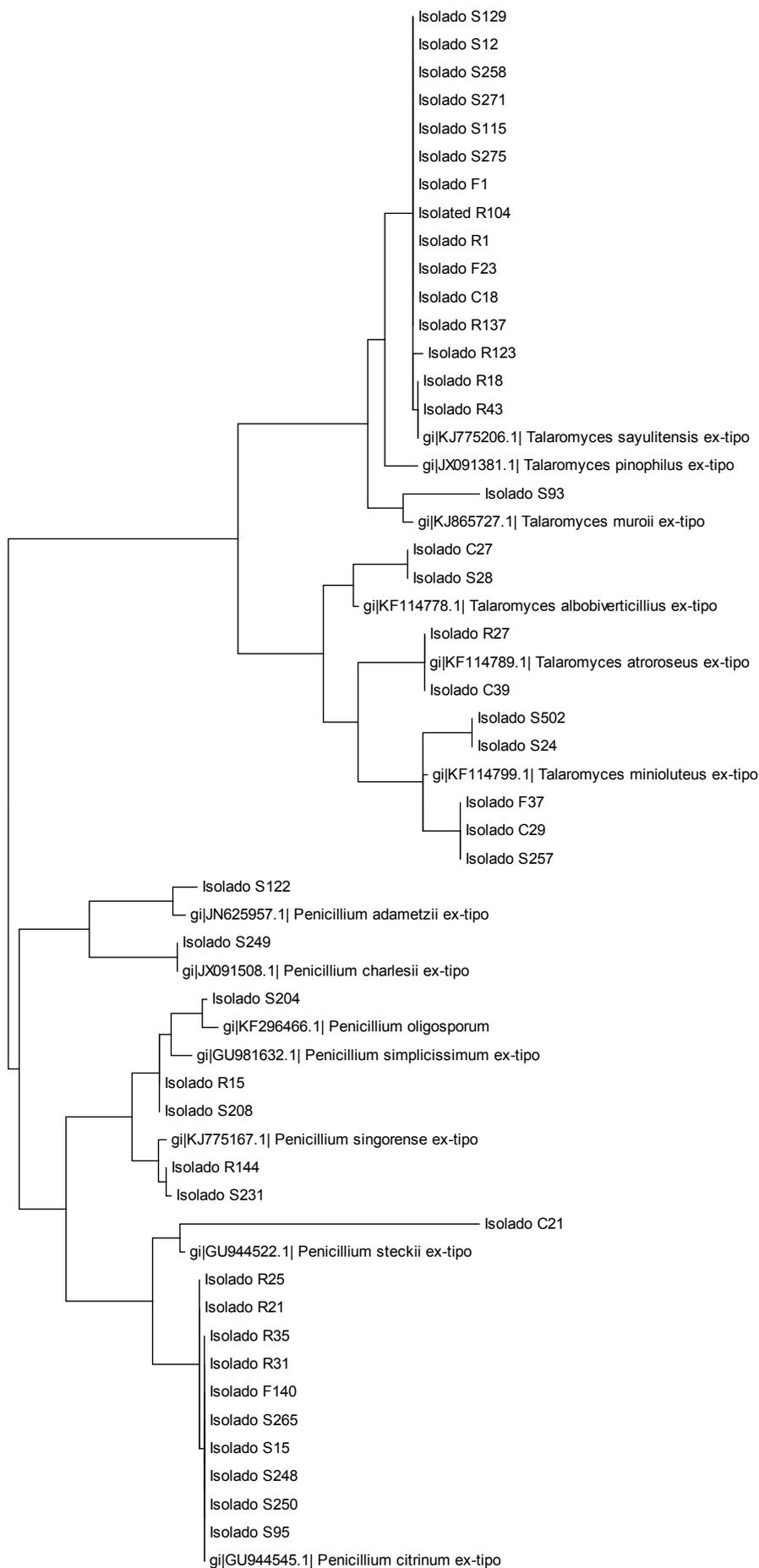


Figura 4. Filogenia de *Penicillium* sensu lato a partir da região ITS, incluindo os isolados dos diferentes tecidos e solo rizosférico e espécies tipo (ex tipo) depositadas GenBank.

Para o alinhamento do conjunto de dados BenA a partir das ampliações da região da β -tubulina foram utilizados amplicons com aproximadamente 614 bp e incluiu 63 estirpes. A análise ML (Maximum-likelihood), foi realizada com o modelo mais adequado, o K2 + G (Figura 5).



0.1

Figura 5. Filogenia de *Penicillium* sensu lato a partir da região BenA, incluindo os isolados dos diferentes tecidos e solo rizosférico e espécies tipo (ex tipo) depositadas GenBank.

Discussões

Isolamentos e cultivo de *Penicillium* sensu lato

O maior número de isolados obtidos de rizosfera se deve ao fato de que *Penicillium* spp. são comumente encontrados em solos pois atuam na reciclagem de matéria orgânica. Sobretudo, em solo rizosférico onde as raízes estão diretamente relacionadas há absorção de nutrientes para a planta, aumentado assim a disponibilidade desses nutrientes aos micro-organismos associados (PELCZAR, 1981; PITT, 1991; MELO e AZEVEDO, 2008; CANOVA, 2009). Nas raízes o número de isolados foi maior quando comparado aos tecidos de caule e folha que são tecidos bastante fibrosos

É fundamental estudar as interações entre os micro-organismos e os vegetais pois esta comunidade microbiana pode participar do desenvolvimento do vegetal de várias formas: benéfica (simbiose, biocontrole, fixação de nitrogênio), neutra ou variável (liberação de enzimas e competição) ou prejudicial (patologias e fitoxidade). Como os fungos que habitam o solo rizosférico em sua maioria são reportados por sua ação benéfica aos vegetais hospedeiros e também por apresentarem características promissoras como agentes biocontroladores de fitopatógenos (FERREIRA, 2008). A diversidade de *Penicillium* sensu lato em sisal permitirá estudá-los quanto o controle da podridão vermelha mesmo porque este grupo tem sido reportado como agente biocontrolador em outras culturas (SUN; CHEN; GUO, 2014; SINGH *et al.*, 2014). Adicionalmente, existe o aporte biotecnológico de fungos do grupo dos *Penicillium* sensu lato na produção de compostos metabólicos, enzimáticos e de pigmentos de interesse industrial (REYES *et al.* 1999, NARIKAWA *et al.* 2000; FUJII *et al.* 2013, HOUBRAKEN *et al.* 2014; SINGH *et al.*, 2014).

Identificação molecular e filogenia de *Penicillium* sensu lato

Neste estudo foram identificadas espécies biverticiladas associadas a cultura de sisal. Pitt (1991) inclui as espécies biverticiladas divididas em dois subgêneros, *Furcatum* Pitt e *Biverticillium* Direckx. Pitt (1979) em um sistema de classificação considerando o padrão de ramificação de *Penicillus*, *P. citrinum* foi incluído no subgênero *Furcatum* na seção Citrina. Em um estudo utilizando bases morfológica e filogenética, Houbraken, Frisvad e Samson (2010), colocaram várias espécies (*P. baradicum*, *P. gorlenkoanum*, *P. botryosum*, *P.*

sartoryi, *P. steckii*, *P. aurifluum* e *P. sutil.*) em sinonímia com *P. citrinum*. Assim como nesse estudo as espécies de *P. citrinum* e *P. steckii*, em análise filogenética com regiões de BenA, também agruparam-se confirmando essa relação filogenética.

Penicillium citrinum apresenta ampla distribuição, muito comumente encontrado em uma diversidade de ambientes, isolados a partir de vários substratos (SAMSON *et al.*, 2004), no entanto como endofítico de sisal, é o primeiro relato. Outro grupo de biverticilados foram identificadas na cultura estudada, sendo esse tipo mais abundante tanto em rizosfera quanto como endofíticos de sisal, que foram as espécies de *Talaromyces* pertencentes ao subgênero *Biverticillium*, um grupo bastante divergente dos outros subgêneros desses fungos (PITT 1991; SAMSON *et al.*, 2011).

Espécies de *P. citrinum* já foram isoladas a partir de vários substratos, do solo que é comum para esse grupo, do ar, alimentos, como endofíticos de raiz, caule e folhas de café (POSADA *et al.*, 2007). Assim como *P. steckii* que possui relatos como isolados dos mais diversos ambientes, além do solo, de água hipersalina, peixes, alcachofra e também como endofíticos de raiz da planta de café (POSADA *et al.*, 2007). Esses fungos são conhecidos como produtores de micotoxinas citrina (HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2010)

P. oligosporum, *P. simplicissimum*, *P. admatezii*, *P. singorense*, *P. charlesii* são espécies do subgênero *Aspergilloides*, distribuídas em três seções distintas, *Lanata-divaricata* (*P. singorense*, *P. oligosporum* e *P. simplicissimum*), *Charlesia* (*P. charlesii*) e *Sclerotiora* (*P. admatezii*) (VISAGIE *et al.*, 2014), sendo a espécie *P. oligosporum* Saito e Minoura (1948) sinônima à *Penicillium javanicum* Beyma (1929). Essas espécies são classificadas neste subgênero por apresentarem característicos conidióforos monoverticilados (PITT, 1991).

P. simplicissimum foi reportado por Bergsten-Torrallba *et al.* (2009) como uma espécie eficiente na descoloração de diferentes corantes têxteis e a mistura deles, com redução significativa da sua toxicidade, apresentando um importante aporte biotecnológico.

Em estudos anteriores, as espécies do subgênero *Biverticillium* eram consideradas como um grupo polifilético onde *Penicillium* eram as formas assexuadas e *Talaromyces* eram as formas sexuadas desses fungos (LOBUGLIO *et al.*, 1993; BERBEE *et al.*; 1995; OGAWA *et al.*, 1997; OGAWA & SUGIYAMA 2000; PETERSON, 2000; HEREDIA *et al.*, 2001; WANG e ZHUANG 2007). No entanto, uma mudança no Código Internacional de Nomenclatura para fungos, algas e plantas para única nomenclatura (MCNEILL *et al.*, 2012), foi combinada à mudança nessa classificação, permitindo assim que as espécies filogeneticamente iguais sejam tratadas como único nome, independentemente da fase reprodutiva que esses organismos se encontram (YILMAZ *et al.*, 2014). Assim todas as

espécies de *Penicillium* do subgênero *Biverticillium* formam um clado único monofilético e são chamadas de *Talaromyces* (SAMSON *et al.*, 2011). As espécies de *Talaromyces* identificadas ao longo do tempo passaram por classificações, que foram se ajustando com estudos mais apurados utilizando a filogenia somada a caracteres morfológicos. As espécies identificadas nesse estudo seguiram a nova classificação para este gênero e essas estão respresentadas na Tabela 2 com as conclusões taxônomicas de diferentes autores.

O gênero *Talaromyces* inclui espécies que possuem capacidade de produzir enzimas e pigmentos solúveis, uma das espécie com esse potencial, é *T. pinophilus* que possui relato como um fungo importante na degradação de celulose (FUJII *et al.*, 2013, HOUBRAKEN *et al.*, 2014). Essa característica relatada pode estar presente na estirpe de *T. pinophilus* identificada neste trabalho, pois essa foi isolada como endofítica de sisal, estando presente em todos os tecidos, podendo produzir enzimas que favoreçam essa sua colonização.

Talaromyces sayulitensis e *Talaromyces atroroseus* são espécies com relatos mais recentes entre as espécies isoladas neste estudo, foram recentemente descritas por Visagie *et al.*, 2014 e Yilmaz *et al.*, 2013, respectivamente.

Talaromyces atroroseus, *T. minioluteus* e *T. albobiverticillius* também apresenta importante potencial biotecnológico pois produzem pigmentos que são aproveitados como corantes na industria alimentícia (FRISVAD *et al.*, 2013). Nas estirpes isoladas de sisal dessas espécies não foram visualizados esses pigmentos, talvez pelo meio de cultura e condições utilizadas terem sido diferente do especificado por YILMAZ *et al.* (2014). Sendo assim, esses fungos são relevantes para serem estudados, explorando outros aspectos como biotecnológico e, na sua relação com o meio que se encontra, pois podem proporcionar benefícios com sua associação.

Tabela 2. Revisão da classificação do gênero *Talaromyces* considerando a morfologia de anamorfos e teleomorfos e a classificação mais recente de único nome com suporte de análise polifásica (morfológica e molecular).

Nome original	Rai <i>et al.</i> , 1969	Pitt, 1980	Samson <i>et al.</i> 2011	Peterson e Jurjeviæ, 2013	Nome atual
<i>Penicillium pinophilum</i> , (Thom <i>et al.</i> , 1910)	<i>Penicillium korosum</i>	-	<i>Talaromyces pinophilus</i>	-	<i>Talaromyces pinophilus</i>
<i>Penicillium minioluteum</i> (Dierckx, 1901)	-	-	<i>Talaromyces minioluteus</i>	-	<i>Talaromyces minioluteus</i>
<i>Talaromyces atroroseus</i> (Frisvad <i>et al.</i> , 2013)	-	-	-	-	<i>Talaromyces atroroseus</i>
<i>Penicillium allahabadense</i> (Mehrotra & Kumar, 1962)	-	<i>P. pinophilum</i>	<i>T. allahabadensis</i> ,	<i>T. allahabadensis</i>	<i>T. allahabadensis</i>
<i>Penicillium albobiverticillium</i> (Hsieh <i>et al.</i> , 2010)	-	-	<i>Talaromyces albobiverticillus</i>	-	<i>Talaromyces albobiverticillus</i>
<i>Talaromyces muroii</i> (Yaguchi, Someya e Udagawa, 1994)	-	-	-	-	<i>Talaromyces muroii</i>
<i>Talaromyces sayulitensis</i> (Visagie <i>et al.</i> , 2014)	-	-	-	-	<i>Talaromyces sayulitensis</i>

Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste estudo foi possível isolar diferentes espécies de *Penicillium* sensu lato associadas à cultura de sisal.

Os *primers* de ITS e BeanA utilizados neste trabalho são considerados como *barcoding* em estudos com esses fungos.

Este estudo contribui para a taxonomia de fungos, pois traz novo registro de hospedeiro para este grupo.

Além disso, existem diversos estudos com as espécies identificadas como *Talaromyces atroroseus*, *T. minioluteus*, *T. albobiverticillius* e *T. pinophilus* quanto aos seus potenciais biotecnológicos, evidenciando a importancia de explorar estes fungos em estudos futuros, tais como aqueles que visam favorecer a própria cultura de origem dessas espécies.

Referências

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215, 403-410, 1990.

BERBEE, M. L.; YOSHIMURA, A.; SUGIYAMA, J. *et al.* 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, 1995.

CANDEIAS, E. L.; SANTOS, M.L.; DUARTE, E. A. A. *et al.* Fungos endofíticos de raízes de sisal antagonistas ao *Aspergillus Niger*. **Agrotrópica** 28(1), 29 – 36, 2016.

CANOVA, S. P. **Diversidade e Bioprospecção de Actinobactérias Isoladas de Manguezais**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CLARK, F. E. **Agar-plate method for total microbial count**. In: Black, C.A., Evans, D.D., White, J.L., Ensminger, L.E., Clark, F.E., Dinauer, R.C. (Eds.), *Methods of soil analysis - Part 2*. Madson Inc., New York, 1460-1466, 1965.

COLLADO, G., R. *et al.* Biologically active sesquiterpenoid metabolites from the fungus *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, v. 41, n., p. 513–517, 1996.

DIERCKX, R. P. Essai de revision du genre *Penicillium* Link. Note preliminaire. **Annales de la Societe Scientifique de Bruxelles**. 25(1), 1-88, 1901.

FERREIRA, A. **Interação entre bactérias endofíticas e do rizoplano com Eucalyptus**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 77p, 2008.

FRISVAD, J. C.; YILMAZ, N.; THRANE, U. *et al.* *Talaromyces atroroseus*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments (SE Baker, Ed.). **PLoS One** 8,

e84102, 2013.

FUJII, T.; HOSHINO, T.; INOUE, H. *et al.* Taxonomic revision of the cellulose degrading fungus *Acremonium cellulolyticus* nomen nudum to *Talaromyces* based on phylogenetic analysis. **FEMS Microbiology Letters**. 351, 32–41, 2013.

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

HAWKSWORTH, D. L.; CROUS, P. W.; REDHEAD, S. A. *et al.* The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature. **IMA Fungus**, 2, 105–112, 2011.

HEREDIA, G.; REYES, M.; ARIAS, R. M.; BILLS, G. F. *Talaromyces ocotl* sp. nov. and observations on *T. rotundus* from conifer forest soils of Veracruz State, Mexico. **Mycologia** 93: 528–540, 2001.

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. Advances in **Applied Microbiology**. 86, 199–249, 2014.

HOUBRAKEN, J. & SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies in Mycology**. 70, 1–51, 2011.

HOUBRAKEN, J. A. M. P.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. **Fungal Diversity** 44, 117–133, 2010.

HSIEH, H. M.; JU, Y. M.; HSIEH, S. Y. *Penicillium albobiverticillium* sp. nov., a new species producing white conidial masses from biverticillate penicillia. **Fungal Science**. 25, 25-31, 2010.

JOHN VENN. On the diagrammatic and mechanical representation of propositions and reasonings. The London, Edinburgh, and Dublin. **Philosophical Magazine and Journal of Science**, 9, 1–18, 1880.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica**. 8 ed. São Paulo: Sarvier, 129-212, 1991.

LOBUGLIO, K. F.; PITT, J. I.; TAYLOR, J. W. Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual *Penicillium* species in subgenus *Biverticillium*. **Mycologia** 85, 592–604, 1993.

MCNEILL, J.; BARRIE, F. F.; BUCK, W. R. *et al.* (eds) **International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants** (Melbourne Code). Koeltz Scientific Books, Königstein [Regnum vegetabile no. 154.]. 2012.

MEHROTRA, B. S. & KUMAR, D. A. A new species of *Penicillium* from India. **Canadian Journal of Botany**. 40(10), 1399-1400, 1962.

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 647, 2008.

NARIKAWA, T.; SHINOYAMA, H.; FUJII, T. A. α -rutosidase from *Penicillium rugulosum* IFO 7242 that is a peculiar flavonoid glycosidase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 64, 1317–1319, 2000.

NORVELL, L. L. Fungal nomenclature. 1. Melbourne approves a new code. **Mycotaxon** 116: 481–490, 2011.

OGAWA, H. & SUGIYAMA, J. Evolutionary relationships of the cleistothecial genera with *Penicillium*, *Geosmithia*, *Merimbla* and *Sarophorum* anamorphs as inferred from 18S rDNA sequence divergence. In: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification* (Samson RA, Pitt JI, eds) **Plenum Press**, New York: 149–161, 2000.

OGAWA, H.; YOSHIMURA, A.; SUGIYAMA J. Polyphyletic origins of species of the anamorphic genus *Geosmithia* and the relationships of the cleistothecial genera: Evidence from 18S, 5S and 28S rDNA sequence analyses. **Mycologia**, 89: 756–771, 1997.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: MacGraw-Hill Ltda, 2, 1981.

PETERSON, S. W. & JURJEVIEAC, Z. *Talaromyces columbinus* sp. nov., and genealogical concordance analysis in *Talaromyces* Clade 2a. **PLoS ONE** 8, e78084, 2013.

PETERSON, S. W. Phylogenetic analysis of *Penicillium* species based on ITS and LSU-rDNA nucleotide sequences. In: *Integration of modern taxonomic for Penicillium and Aspergillus classification* (Samson RA, Pitt JI, eds). Harwood Academic Publishers, Amsterdam: 163–178, 2000.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification* (Samson RA, Pitt JI, eds). **Harwood Academic Publishers**, Amsterdam: 9–79, 2000.

PITT, J. I. **A laboratory Guide to Common *Penicillium* Species**. North Wales: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing, 1991.

PITT, J. I. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. **Academic Press**, London, 1980.

POSADA, F.; AIME, M.; PETERSON, S. W. *et al.* Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Mycological Research** 111, 748–757, 2007.

RAI, J. N.; WADHWANI, K.; TEWARI, J. P. *Penicillium korosum* sp. n. **Antonie van Leeuwenhoek**. 35(4), 430–432, 1969.

REYES, I.; BERNIER, L.; SIMARD, R. R. *et al.* Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV induced mutants. **FEMS Microbiology Ecology**. 28, 291–295, 1999.

- SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U. *et al.* Food and indoor fungi. CBS KNAW **Biodiversity Center**, Utrecht. 2010.
- SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U. *et al.* Food and indoor fungi. CBS laboratory manual series 2. Utrecht: CBS KNAW **Fungal Biodiversity Centre**. p. 390. 2010.
- SAMSON, R. A.; YILMAZ N, HOUBRAKEN J, *et al.* Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology** 70, 159–183, 2011.
- SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: new Taxonomic Schemes Mycotoxins and Other Extralites. **Studies in Mycology** 49, 1-260, 2004.
- SINGH, D.; RATHOD, V.; NINGANAGOUDA, S. *et al.* Optimization and Characterization of Silver Nanoparticle by Endophytic Fungi *Penicillium* sp. Isolated from *Curcuma longa* (Turmeric) and Application Studies against MDR *E. coli* and *S. aureus*. **Bioinorganic Chemistry and Applications**. 10. 8 p. 2014.
- SUN, S; CHEN, X; GUO, S. Analysis of endophytic fungi in roots of *Santalum album* Linn. And its host plant *Kuhnia rosmarinifolia* Vent. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**. 15(2):109-115,2014.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D. *et al.* Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 30 2725-2729, 2013.
- THOM, C. Cultural studies of species of *Penicillium*. U.S.D.A. Bureau of Animal **Industry Bulletin**. 118, 1-107, 1910.
- VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C. *et al.* Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**. 78, 343–371, 2014.
- VISAGIE, C. M.; HIROOKA, Y.; TANNEY, J. B. *et al.* *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. **Studies in Mycology** 78, 63–139, 2014.
- WANG, L., ZHUANG, W. Y. Phylogenetic analyses of penicillia based on partial calmodulin gene sequences. **BioSystems** 88, 113–126, 2007.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR protocols: a guide to methods and applications** (Innis MA, Gelfand DH, Shinsky TJ, White TJ, eds). Academic Press Inc, New York: 315–322, 1990.
- YAGUCHI, T.; SOMEYA, A.; UDAGAWA, S. Two new species of *Talaromyces* from Taiwan and Japan. **Mycoscience**. 35(3), 249-255, 1994.
- YILMAZ, N.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J. *et al.* The polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in Mycology**. 78, 175–341, 2014.
- YILMAZ, N.; VISAGIE, C. M.; FRISVAD, J. C. *et al.* Taxonomic re-evaluation of species in *Talaromyces* section *Islandici*, using a polyphasic approach. **Research article**. 36, 37–56, 2016.

