

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ÁREA: MICROBIOLOGIA APLICADA)

---

**DANILO AUGUSTO POLEZEL**

**Taxonomia e potencial antimicrobiano de fungos depositados no acervo de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

**Rio Claro**

**2015**

DANILO AUGUSTO POLEZEL

**Taxonomia e potencial antimicrobiano de fungos depositados no acervo de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

**Rio Claro**

**2015**

576 Polezel, Danilo Augusto  
P765t Taxonomia e potencial antimicrobiano de fungos depositados no acervo de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP / Danilo Augusto Polezel. - Rio Claro, 2015  
64 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: André Rodrigues  
Coorientador: Henrique Ferreira

1. Micro-organismos. 2. Identificação. 3. Microsatélites. 4. Difusão em ágar. 5. Produtos naturais. 6. Microbiologia. I. Título.

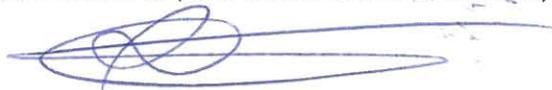
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Taxonomia e potencial antimicrobiano de fungos depositados no acervo de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da Unesp

**AUTOR:** DANILO AUGUSTO POLEZEL

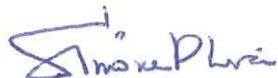
**ORIENTADOR:** Prof. Dr. ANDRE RODRIGUES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIENCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA) , pela Comissão Examinadora:

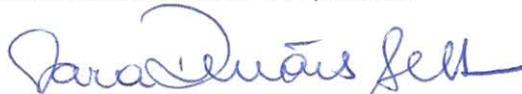


Prof. Dr. ANDRE RODRIGUES

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biotecnologia de Rio Claro



Profa. Dra. SIMONE POSSEDENTE DE LIRA  
Universidade de São Paulo, ESALQ



Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biotecnologia de Rio Claro

Data da realização: 09 de abril de 2015.

*Dedico este trabalho a Deus, pela presença em minha vida  
e luz nos meus caminhos.  
Aos meus pais José e Zélia, minha eterna gratidão  
pelo amor incondicional, pelo carinho,  
apoio e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

Agora termina mais um ciclo em minha vida, que foi marcado por dedicação, conquista, renúncia, aprendizado e crescimento. Neste caminho que percorri, tenho que agradecer à muitos, pois não trilhei sozinho.

Agradeço a “Deus”, pois como um amigo fiel tem realizado os anseios do meu coração e só Ele sabe todas as dificuldades que precisei ultrapassar.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. André Rodrigues, que sempre foi presente, que me acolheu em seu laboratório de braços abertos, sempre com muita paciência para ensinar e corrigir, admiro por sua determinação e ousadia em conquistar seus ideais, é um exemplo para mim.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Henrique Ferreira, obrigado por todo o apoio cedido sempre que solicitado.

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca que me ajudou em momentos difíceis, sempre com ótimos conselhos e me motivando a seguir em frente, sou grato a você professor!

À Profa. Dra. Lara Durães Sette e todos do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI) pela amizade e disponibilidade dos equipamentos de seu laboratório.

A todos os professores e funcionários da UNESP – Rio Claro que me receberam tão bem e todos os amigos feitos neste tempo.

A todos do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), alguns que, infelizmente, não convivo mais, Jaqueline, Sadala, Bárbara e Rafael, e outros que permanecem me ajudando; somos verdadeiramente uma equipe, Tássio, Ana, Julio, Lorena, Bruna, Mariana, Daniel, pelo companheirismo e por me proporcionar bons momentos tanto no laboratório, quanto fora dele. Não poderia ter encontrado um grupo tão único e especial como esse; que me ajudaram muito, especialmente a Bianca, Quimi e Lucas que contribuíram indispensavelmente para realização dos experimentos. Pela amizade, e por tantas experiências vivenciadas juntas durante este período de mestrado.

Agradeço a todos meus amigos do C.E.I.S. pela companhia, risadas e colaboração, principalmente a Weilan, Virgínia, Ife, Silvio, pelas dicas e ajudas e a ótima convivência.

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira e a Dra. Tatiane Albarici (Laboratório de Produtos Naturais – UFSCar, São Carlos) pelo auxílio e disponibilização do laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada) pelo auxílio financeiro concedido para participação em eventos.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais, José e Zélia, e a minha irmã Daiane, por nunca hesitarem em oferecer o melhor para mim. Devo todas minhas conquistas a vocês.

Encerrando, gostaria de agradecer a Isabela Calegari Moia, por permanecer e me apoiar nos momentos difíceis, por preencher minha vida com amor e carinho, me proporcionando alegria e motivação.

*“A sabedoria da vida não está em fazer aquilo que se gosta,  
mas gostar daquilo que se faz.”*

*Leonardo da Vinci*

## RESUMO

As coleções de culturas são importantes pilares na preservação, catalogação e prospecção da biodiversidade microbiana. Com o propósito de atender ao depósito e fornecimento de material biológico de qualidade, a Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) iniciou sua adequação para alcançar os padrões internacionais de operação e gerenciamento; o que inclui a autenticação taxonômica das culturas mantidas na coleção. Utilizando um método de triagem molecular adaptado nesse estudo (microssatélites), aliado ao uso de marcadores morfológicos e moleculares, realizamos a identificação taxonômica de 189 isolados, de um total de 201 fungos filamentosos selecionados com base na diversidade de fontes de isolamento e mantidos no acervo de pesquisa da CRM-UNESP. Com o intuito de agregar informações sobre o potencial biotecnológico desses isolados, também avaliamos a produção de compostos antimicrobianos. Após a reativação e purificação dos isolados, foram identificados 66 gêneros e 116 espécies, sendo que os gêneros mais abundantes foram: *Fusarium* (18,9%), *Clonostachys* (11,4%), *Trichoderma* (7%) e *Penicillium* (6,5%). Todos os 201 isolados foram avaliados quanto à produção de metabólitos secundários com propriedade antibacteriana e antifúngica, segundo um método de alto desempenho (também adaptado neste estudo), frente a micro-organismos de interesse agrícola (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) e clínico (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*). Do total dos cultivos brutos avaliados, a maioria (62,7%) apresentou atividade antagonista frente, a pelo menos, um dos micro-organismos de referência. Os cultivos brutos dos fungos *Penicillium aurantiogriseum* LESF 194, *Clonostachys rosea* LESF 389, *Penicillium dodgei* LESF 487, *Xylaria* sp. 4 LESF 502 e de um isolado não identificado LESF 227 inibiram o crescimento de todos os micro-organismos de referência. Os resultados deste trabalho contribuíram para implantar dois métodos de triagem na rotina de trabalho da CRM-UNESP, os quais possibilitaram agrupar os diversos fungos e avaliar o potencial antimicrobiano dos mesmos. Além disso, o presente estudo contribuiu para a curadoria do acervo da CRM-UNESP, de modo a disponibilizar fungos com identificação autêntica e com potencial biotecnológico conhecido.

**Palavras-chave:** Identificação. Microssatélites. Difusão em ágar. Produtos naturais.

## ABSTRACT

Culture collections are keystones in the preservation, cataloging and exploration of microbial diversity. In order to meet international standards of deposit and supply of biological materials, the UNESP-Microbial Resources Center (CRM-UNESP) started their suitability for functioning and management to reach international standards; which include taxonomic authentication of cultures preserved in the collection. Using an adapted molecular screening protocol (microsatellites) coupled with morphological and molecular markers, we obtained the taxonomic identification of 189 out of 201 filamentous fungi from the CRM-UNESP research collection. In order to gather information on the biotechnological potential of these isolates, we also evaluated the production of antimicrobial compounds. After revival and purification of fungal isolates, we identified 66 genera and 116 species; comprehending the most abundant genera: *Fusarium* (18.9%), *Clonostachys* (11.4%), *Trichoderma* (7%) and *Penicillium* (6.5%). All isolates were evaluated for the production of secondary metabolites with antibacterial and antifungal properties, according to a high-throughput method (also adapted in this study), towards agricultural (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) and clinical-relevant (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida parapsilosis*) reference strains. The majority of culture broths (62.7%) showed antagonist activity against at least one of the reference strains. Culture broths of *Penicillium aurantiogriseum* LESF 194, *Clonostachys rosea* LESF 389, *Penicillium dodgei* LESF 487, *Xylaria* sp. 4 LESF 502 and from the non-identified fungus LESF 227 inhibited the growth of all reference strains. Our results contributed for the establishment of two screening approaches in the routine of CRM-UNESP. These methods allowed the identification of the various fungal isolates examined as well as the evaluation of the antimicrobial potential of such strains. This study also contributed to the curation of the CRM-UNESP collection allowing the accessibility of fungi with authentic identification and with associated biotechnological information.

**Keywords:** Identification. Microsatellites. Disc-diffusion method. Natural products.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Coleções de culturas microbianas: importância e tendências.....	12
2.2 Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).....	14
2.3 Bioprospecção de compostos antimicrobianos de interesse clínico.....	16
2.4 Bioprospecção de compostos antimicrobianos para controle de <i>Xac</i> .....	18
2.5 Triagem de alto desempenho de compostos antimicrobianos.....	19
3 OBJETIVOS.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Origem e reativação dos isolados.....	23
4.2 Identificação dos fungos.....	23
4.3 Ensaio de atividade antimicrobiana.....	25
4.3.1 Preparação dos cultivos.....	25
4.3.2 Linhagens de referência utilizadas nos ensaios.....	25
4.3.3 Padronização das suspensões das linhagens de referência.....	26
4.3.4 Ensaio com os cultivos brutos.....	26
5 RESULTADOS.....	28
5.1 Reativação dos isolados.....	28
5.2 Triagem e identificação dos isolados.....	28
5.3 Ensaio para determinação da atividade antimicrobiana.....	30
6 DISCUSSÃO.....	39
6.1 Triagem e identificação dos fungos do acervo de pesquisa da CRM-UNESP.....	39
6.2 Potencial biotecnológico dos fungos do acervo de pesquisa da CRM-UNESP.....	41
7 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
APÊNDICE A.....	56
APÊNDICE B.....	64

## 1 INTRODUÇÃO

As coleções de culturas microbianas mantêm uma diversidade biológica de elevada importância. Os acervos dessas coleções podem abrigar diversos tipos de micro-organismos, tais como fungos, bactérias, algas, entre outros; provenientes dos mais variados ambientes e substratos. Esses micro-organismos são mantidos de forma a garantir a viabilidade e preservar as características originais das culturas, sejam elas morfológicas, genéticas ou fisiológicas (bioquímicas). Além da preservação, as coleções de culturas microbianas também são importantes centros de pesquisas aplicadas voltadas à indústria, ambiente, agricultura e saúde.

A Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) situa-se no Instituto de Biociências de Rio Claro (UNESP, Câmpus de Rio Claro, SP) e foi criada em 2012 com o objetivo de abrigar micro-organismos originados de diversos ambientes e que apresentam potencial biotecnológico. O acervo da CRM-UNESP conta com cerca de 5.970 culturas, compreendendo bactérias e, principalmente, leveduras e fungos filamentosos, os quais ainda não foram explorados quanto ao potencial de produção de metabólitos bioativos. A busca por fungos que produzam metabólitos ativos deve-se ao aumento da resistência de micro-organismos patogênicos aos antimicrobianos, visto que cada vez mais são poucos os agentes antimicrobianos que realmente podem auxiliar no tratamento de doenças.

Nesse contexto, o presente projeto visou contribuir com o conhecimento da diversidade e do potencial biotecnológico de parte dos fungos filamentosos do acervo de pesquisa da CRM-UNESP, o qual é derivado dos estudos do grupo de pesquisa do Prof. André Rodrigues, coordenador do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF). A fim de autenticar as culturas mantidas na coleção, inicialmente um total de 215 isolados de fungos filamentosos foi selecionado com base na diversidade de fontes de isolamento de onde os fungos foram obtidos, a saber: formigas, solo, folhas e compostagem. Os isolados foram triados utilizando a técnica de microssatélites e, posteriormente, caracterizados utilizando marcadores moleculares.

Adicionalmente, os isolados foram avaliados quanto ao potencial de produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana frente a micro-organismos de interesse agrícola e clínico. Foi utilizado um método de alto desempenho adaptado neste trabalho, o qual permitiu triar de forma rápida e eficaz os isolados produtores desses compostos.

Os resultados do presente estudo permitiram verificar que dentre os 215 isolados, 201 apresentavam-se viáveis. O método de microssatélites permitiu triar os isolados de modo a diminuir o número de fungos submetidos ao sequenciamento. A abordagem polifásica

permitiu identificar 66 gêneros e 116 espécies. O método adaptado de difusão em meio sólido mostrou ser eficaz para a avaliação da atividade antimicrobiana dos cultivos brutos.

Os dados gerados no presente estudo evidenciam a importância do patrimônio genético preservado no acervo da CRM-UNESP, no que tange ao potencial biotecnológico dos fungos da coleção. Além disso, o trabalho taxonômico realizado nesse estudo permitiu autenticar as culturas do acervo, de modo a disponibilizar um material com qualidade assegurada para estudos futuros.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### *2.1 Coleções de culturas microbianas: importância e tendências*

A atividade primordial desempenhada pelas coleções biológicas é a salvaguarda dos recursos naturais para conservação da biodiversidade e atividade de Pesquisa e Desenvolvimento - P&D (SMITH, 2012; SETTE; PAGNOCCA; RODRIGUES, 2013). Esses autores discutem que as coleções biológicas buscaram a modernização de seus procedimentos ao longo dos anos. No caso de coleções de culturas, diversos métodos de identificação e preservação de linhagens microbianas foram adotados na rotina de trabalho. O processo de atualização e modernização, portanto, agregou valor ao patrimônio genético mantido nos acervos, pois possibilitou a implementação de métodos rápidos de autenticação taxonômica de culturas, o que indiretamente levou a um maior acesso às informações relativas ao potencial biotecnológico dos organismos mantidos no acervo.

A principal finalidade de uma coleção de cultura microbiana é a preservação dos micro-organismos para estudos futuros. Nesse sentido, as coleções de culturas microbianas devem estar preparadas para abrigar os mais diversos tipos de micro-organismos. Esta preservação deve manter as condições originais da cultura, de modo que não ocorram alterações nas suas características morfológicas, fisiológicas e genéticas, bem como manter a viabilidade e pureza dos micro-organismos (ABREU; TUTUNJI, 2004; OLIVEIRA; SETTE; GARBOGGINI, 2006; SETTE; PAGNOCCA; RODRIGUES, 2013). Assim, um exemplo da importância das coleções de culturas microbianas é a preservação de micro-organismos de difícil cultivo ou que apresentem limitações na sua manipulação (por exemplo, micro-organismos derivados de ambientes extremos, como aqueles encontradas na Antártica). Esses micro-organismos devem ser preservados com diferentes métodos, os quais são encontrados nas coleções de culturas (OLIVEIRA; SETTE; GARBOGGINI, 2006). Esses centros especializados aplicam várias técnicas de preservação, de acordo com o tipo de micro-organismo, a saber: criopreservação (a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), preservação em sílica, preservação em água destilada estéril, preservação em solo estéril, preservação em meio de cultivo, preservação de culturas liofilizadas (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000; ABREU; TUTUNJI, 2004).

A política nacional de P&D enfatiza a importância do material biológico depositado em coleções de culturas microbianas como uma rica fonte de patrimônio genético, com aplicação no setor biotecnológico. Assim, políticas de financiamento e suporte às coleções de

culturas microbianas foram criadas pelo governo brasileiro para manter o vínculo entre os recursos genéticos encontrados nos repositórios e a aplicação para diversos setores da sociedade, especialmente em P&D (BRASIL, 2002).

Considerando o interesse do setor biotecnológico na obtenção de material biológico de elevada qualidade e tendo em vista a ampla atuação das coleções de culturas microbianas em escala global, foram propostas diretrizes internacionais de boas práticas para que essas se adequem e se tornem Centros de Recursos Biológicos (CRBs). Um CRB pode ser considerado como um novo conceito de coleção biológica, com um sistema operacional que utiliza práticas padronizadas, com qualidade no gerenciamento do acervo e prestação de serviço para a comunidade científica (WFCC, 1999).

Com os avanços da biotecnologia e bioeconomia a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) propôs a criação de uma rede de CRBs (conhecida como *Biological Resource Centre Network*), a qual congrega os CRBs reconhecidos pelo próprio país membro da rede (OCDE, 2001). O reconhecimento de um CRB é uma tarefa designada para cada país, entretanto, para orientar os países quanto aos critérios mínimos exigidos para um CRB, a OCDE elaborou um guia de boas práticas, o qual enfatiza a biossegurança, bioproteção e controle de qualidade em CRB (OCDE, 2007).

As diretrizes propostas pela OCDE consideram a qualidade e autenticidade dos materiais depositados nas coleções, como critérios para credenciamento como CRB. Assim, as coleções visam manter a viabilidade das culturas, a qualidade delas (livre de contaminações), desde o depósito até o seu fornecimento para terceiros. Além disso, prezar pelo acesso às informações associadas a cada cultura microbiana, sendo que os dados devem ser disponibilizados em sistemas informatizados para que fiquem facilmente disponíveis à comunidade (OCDE, 2007).

Portanto, as coleções de culturas microbianas (e outras coleções biológicas) que desejam tornarem-se CRBs, devem apresentar uma infraestrutura mínima que preze os cuidados na manipulação dos micro-organismos e das informações associadas a estes. Os profissionais envolvidos devem ser treinados em taxonomia, preservação e manipulação de culturas. Adicionalmente, o profissional necessita familiarizar-se com os procedimentos de fornecimento dos micro-organismos, seguindo todas as normas nacionais e internacionais em relação ao controle no transporte, saúde e segurança voltados aos recursos microbianos (SMITH, 2012). É importante notar que esses aspectos refletem em melhores práticas e uma linha confiável para a implementação de biossegurança e bioproteção para todas as outras

instituições que trabalham com recursos microbiológicos, além dos CRBs (ROHDE et al., 2013).

Um outro procedimento desejável para as coleções de cultura é o registro no *World Data Centre for Microorganisms* (WDCM), mantido pela *World Federation for Culture Collections* (WFCC). Tal registro visa divulgar para a comunidade internacional, os serviços oferecidos e informações sobre o acervo da coleção. As estatísticas fornecidas pelo WDCM são atualizadas periodicamente. Até a data do presente trabalho, o WDCM registra 692 coleções de culturas, reunindo mais de 2,4 milhões de micro-organismos. Tal informação é bastante útil para pesquisadores e companhias que procuram por micro-organismos de interesse (WDCM, 2015).

## 2.2 Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP)

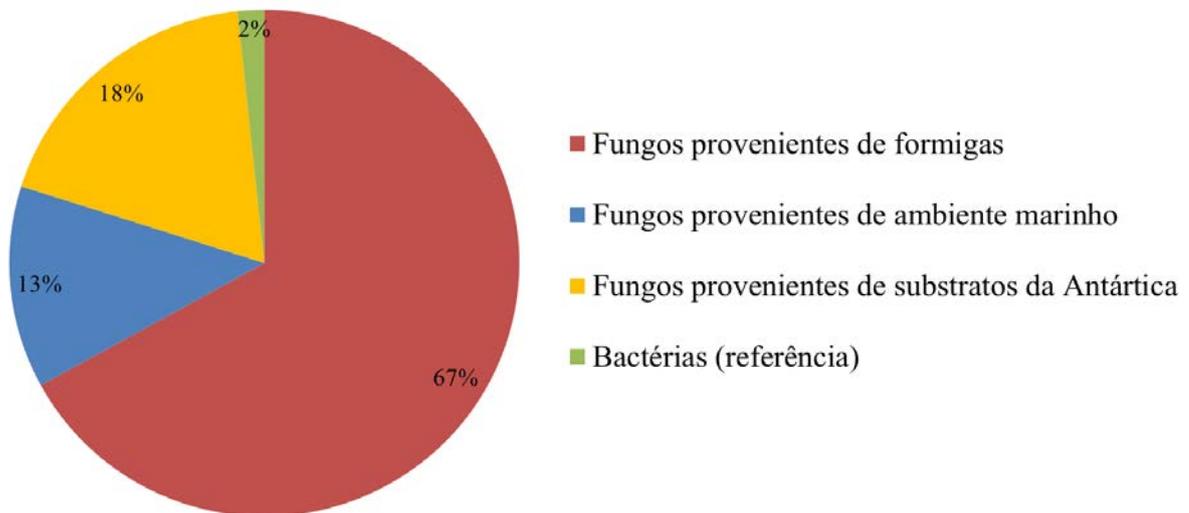
A CRM-UNESP está situada nas dependências do Instituto de Biociências de Rio Claro (IB), UNESP – Câmpus Rio Claro, SP. A CRM-UNESP, criada em 2012, foi institucionalizada através da portaria IB nº 4, publicada em 8 de fevereiro de 2013. Atualmente, a coleção conta com uma equipe de dois curadores e um gerente executivo (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO” CÂMPUS DE RIO CLARO, 2013).

O início da CRM-UNESP foi promovido a partir do acervo de leveduras existente na Coleção de Micro-organismos do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS, UNESP – Câmpus Rio Claro). Em seguida, demais coleções de fungos associadas as pesquisas dos docentes do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, da mesma instituição, foram incorporadas à coleção. Desse modo, os laboratórios base da CRM-UNESP são: Laboratório de Microbiologia (LM/CEIS), Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI) e Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF). Tais laboratórios são coordenados por professores especialistas nas áreas de sistemática, taxonomia, bioprospecção, biotecnologia, isolamento e preservação de micro-organismos. Estes laboratórios contam com infraestrutura de cultivo e preservação de culturas microbianas ideais para a realização das atividades de rotina da coleção.

O acervo da CRM-UNESP compreende cerca de 5.970 culturas associadas, abrangendo vários grupos microbianos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias (Figura 1). A maioria delas é derivada de vários ambientes como ninhos de formigas, áreas

impactadas com petróleo e também associados a ambientes marinhos da costa brasileira e marinhos e terrestres da Antártica. Do total de culturas do acervo, atualmente 1.347 estão depositadas no acervo principal da coleção, o qual congrega isolados microbianos identificados e viáveis em sua última reativação. Os micro-organismos aí depositados contam com o registro dos metadados associados e que estão em processo de disponibilização no sistema informatizado ( $\mu$ SICol).

Figura 1. Grupos microbianos e substratos de origem (em %) dos isolados mantidos na Central de Recursos Microbianos da UNESP. As porcentagens são referentes ao total de 5.970 culturas mantidas nos acervos de pesquisa da coleção.



Fonte: Lara Durães Sette (comunicação pessoal). “Bactérias de referência” são isolados utilizados com referência em P&D e que também estão depositados em outras coleções de cultura (ex: *American Type of Culture Collection - ATCC*).

A CRM-UNESP representa uma rica fonte de recursos genéticos específicos para aplicações em P&D, pois os micro-organismos mantidos no acervo podem apresentar propriedades únicas. Esses micro-organismos podem produzir uma ampla gama de compostos com diversas funcionalidades para o homem. Assim, estudos que visem explorar o acervo associado a CRM-UNESP são fundamentais para conhecer o potencial desses micro-organismos.

Com o intuito de aprimorar a CRM-UNESP em uma coleção de cultura de porte nacional e internacional e torná-la um CRB, a coleção necessita enquadrar-se nas diretrizes de boas práticas da OCDE. Tais providências estão em andamento pelo corpo administrativo da coleção, sendo que a CRM-UNESP já está credenciada junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), como instituição fiel depositária, através do aviso de

credenciamento nº 085/2013/SECEX/CGEN. A CRM-UNESP também está cadastrada no WDCM, sob o registro número 1043.

Além dessas iniciativas, um dos requisitos básicos para tornar-se um CRB é organizar todas as informações associadas à cada cultura em um sistema informatizado, o qual disponibilize esses metadados para o público. No sentido de auxiliar a informatização dos acervos das coleções biológicas nacionais, o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCTI) por intermédio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) promoveu a chamada de projetos “Chamada MCTI/CNPq nº 45/2012 - Sistema de Informações sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr) - Coleções Biológicas”. A CRM-UNESP participou dessa chamada com o seguinte projeto, aprovado: “Informatização e disponibilização dos dados associados ao acervo do Centro de Recursos Microbianos da UNESP” (Processo CNPq n. 504130/2012-9). Tal projeto possibilitou a implantação de um sistema local informatizado de gerenciamento do acervo ( $\mu$ SICol). Esse sistema está integrado ao Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico (SICol, <http://sicol.cria.org.br>), desenvolvido pelo Centro de Referência em Informação Ambiental (CRIA). O SICol também está integrado à rede *speciesLink* (<http://splink.cria.org.br>), a qual abriga informações em tempo real de diversas coleções biológicas do país e apresenta várias ferramentas de análise e modelagem da distribuição da diversidade de organismos no território brasileiro. As informações associadas aos micro-organismos do acervo principal da CRM-UNESP também estarão disponíveis no SiBBr, correspondendo a indicação do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) buscando agregar as informações sobre ecossistemas e a biodiversidade.

### *2.3 Bioprospecção de compostos antimicrobianos de interesse clínico*

Dentre as classes de metabólitos secundários produzidas por fungos, os policetídeos apresentam uma diversidade estrutural e funcional. Estes geralmente apresentam atividades em diversos sistemas biológicos, como antitumorais, antiparasitários e antimicrobianos. Portanto, a busca por novas classes de metabólitos secundários em micro-organismos, a exemplo dos policetídeos, é uma potencial fonte de precursores de substâncias bioativas (YADAV; GOKHALE; MOHANTY, 2003; CASTOE et al., 2007; EVANS; ROBINSON; KELLEHER, 2011).

Descoberta em 1928, a penicilina foi o primeiro metabólito secundário de origem fúngica com ação inibitória do crescimento de outros micro-organismos. Produzida pelo fungo identificado originalmente como *Penicillium chrysogenum*, a penicilina proporcionou o fenômeno da antibiose, o qual foi observado e estudado por Alexander Fleming durante vários anos (KOROLKOVAS; BURKHALTER, 1988). A linhagem original estudada por Fleming foi recentemente reidentificada como *Penicillium rubens* (HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2011). Alguns anos após sua descoberta, a penicilina foi desenvolvida para uso terapêutico contra infecções por estafilococos e estreptococos, salvando milhares de indivíduos acometidos com esses agentes etiológicos (KOROLKOVAS; BURKHALTER, 1988). Esse episódio na história da humanidade marcou o início da bioprospecção por grandes indústrias farmacêuticas, com o alvo de buscar e explorar micro-organismos que produzam substâncias biologicamente ativas para serem potencialmente empregadas como antibióticos.

Ao longo dos anos foram descobertos vários compostos com atividade antimicrobiana, principalmente, aqueles biossintetizados por actinobactérias do gênero *Streptomyces* (MADIGAN et al., 2010). Contudo, a evolução das doenças infecciosas e o uso irresponsável de medicamentos antimicrobianos nos últimos 65 anos permitiram o surgimento da resistência bacteriana aos antibióticos. Com isso, muitos antimicrobianos perderam a ação, resultando em uma ineficiência dos fármacos disponíveis comercialmente para o controle de infecções bacterianas (BHAVANANI; BALLOW, 2000). Tal fenômeno da resistência levou à busca por novos compostos bioativos, com ação rápida e eficiente. Nesse contexto, as indústrias farmacêuticas investiram por muitos anos na busca de produtos naturais, mas devido aos custos elevados para o financiamento de bioprospecção, essas companhias mudaram o foco para a síntese de compostos sintético ou semi-sintéticos, de modo a suprir o mercado com novos antimicrobianos mais eficientes (OLIVEIRA; PUPO; VIEIRA, 2013).

Diversas bactérias são causadoras de infecções urinárias e gastroenterites, como é caso de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (CAVALCANTI et al., 2005; MYSOREKAR; HULTGREN, 2006). Já os fungos são responsáveis por doenças como infecções de pele, otites, ceratomicoses (infecções de tecidos queratinosos) e fungemias, estas últimas causam grande preocupação clínica (CARMO et al., 2007). Dada a importância das infecções microbianas, o presente trabalho avaliou os fungos selecionados do acervo de pesquisa da CRM-UNESP em relação a sua atividade antimicrobiana frente a bactérias e leveduras de interesse clínico e agrícola.

#### 2.4 Bioprospecção de compostos antimicrobianos para controle de *Xac*

O uso de antimicrobianos não está restrito apenas ao uso clínico, mas também são empregados em diversos outros setores, como na agricultura. Antimicrobianos com atividade fungicida e bactericida podem prevenir perdas nas lavouras de grãos e frutas, devido a ação contra o crescimento de micro-organismos fitopatógenos e aqueles envolvidos em doenças pós-colheita (TAKAHASHI; LUCAS, 2008). Por exemplo, bactérias do gênero *Xanthomonas* são consideradas fitopatógenos severos que ocasionam um impacto negativo na agricultura. Esse gênero apresenta aproximadamente 27 espécies, todas consideradas patógenos de plantas (PARKINSON et al., 2007). As espécies não apresentam diferenças significativas nas características fisiológicas e morfológicas. Todas as espécies do gênero são bacilos Gram-negativos, com 1,7-3,0 µm de comprimento, quimiorganotróficos, aeróbios obrigatórios e com flagelo polar (GARCIA-OCHOA et al., 2000; MEYER; BOGDANOVE, 2009).

Representantes do gênero *Xanthomonas* apresentam colônia de coloração amarela, graças à produção de pigmentos carotenoides, tais como as xantomonadinas. O aspecto liso, brilhante e viscoso da colônia é devido à produção do exopolissacarídeo (ou goma xantana), considerado um fator de virulência que está relacionado a resistência da célula bacteriana e auxilia na formação de biofilmes (MEYER; BOGDANOVE, 2009).

Várias doenças ocasionadas por *Xanthomonas* acarretam grandes prejuízos econômicos na agricultura. As plantas infectadas apresentam lesões com clorose (amarelamento) em forma de V em suas folhas, com o vértice voltado para o centro foliar, enquanto os caules apresentam necrose dos feixes vasculares (MANNERS, 1993; QIAN et al., 2005). O agente etiológico do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* linhagem 306 (neste trabalho abreviado como “*Xac*”) é responsável pela forma asiática do cancro, que afeta todas as espécies de citros comercialmente importantes. As plantas infectadas apresentam lesões nos tecidos aéreos semelhantes a crateras, e com o tempo, a infecção diminui a produtividade (NEVES, 2010).

A principal forma de controlar o cancro cítrico é através de um sistema de erradicação bastante rigoroso, considerado até agora a única estratégia efetiva para evitar o seu avanço em áreas não endêmicas (BELASQUE JUNIOR; FERNANDES; MASSARI; 2009). Nos anos de 1999 até 2009, os produtores do Estado de São Paulo foram obrigados a eliminar todas as plantas contaminadas com incidência acima de 0,5%, erradicando as plantas adjacentes em um raio de 30 metros.

Em 2009, a legislação foi amenizada, e como consequência, o número de novos casos da doença aumentou em 80%, sendo que há um grande risco de endemia do cancro cítrico. Recentemente, houve uma nova alteração na legislação (Resolução SAA - 147, de 31-10-2013), onde não é mais obrigatória realizar a erradicação das plantas que estiverem em um raio de 30 metros, passando a adotar a eliminação da planta contaminada e a pulverização com cobre sobre as plantas no raio de 30 metros.

As práticas adotadas para prevenir novas infecções e a disseminação de *Xac* aumentaram o custo da produção e não são tão efetivas como a erradicação, além de promover o surgimento de linhagens resistentes (CANTEROS, 1999). Como essa doença ainda representa uma ameaça para a agricultura, existe a necessidade do desenvolvimento de métodos mais eficientes e com menores riscos ambientais para o controle da *Xac*.

Embora são poucos os estudos que verificaram o potencial de produtos naturais frente a *Xac*, o presente estudo visou prospectar os fungos selecionados do acervo de pesquisa da CRM-UNESP. Um dos objetivos desse estudo foi selecionar isolados capazes de produzir compostos secundários bioativos frente a esse patógeno de grande importância na agricultura brasileira.

### 2.5 Triagem de alto desempenho de compostos antimicrobianos

A triagem de alto desempenho (HTS - *high throughput screening*) envolve a análise simultânea de um grande número de amostras. Estas podem ser desde micro-organismos até os produtos gerados pelos mesmos, por exemplo, compostos com atividade biológica (FREARSON; COLLIE, 2009).

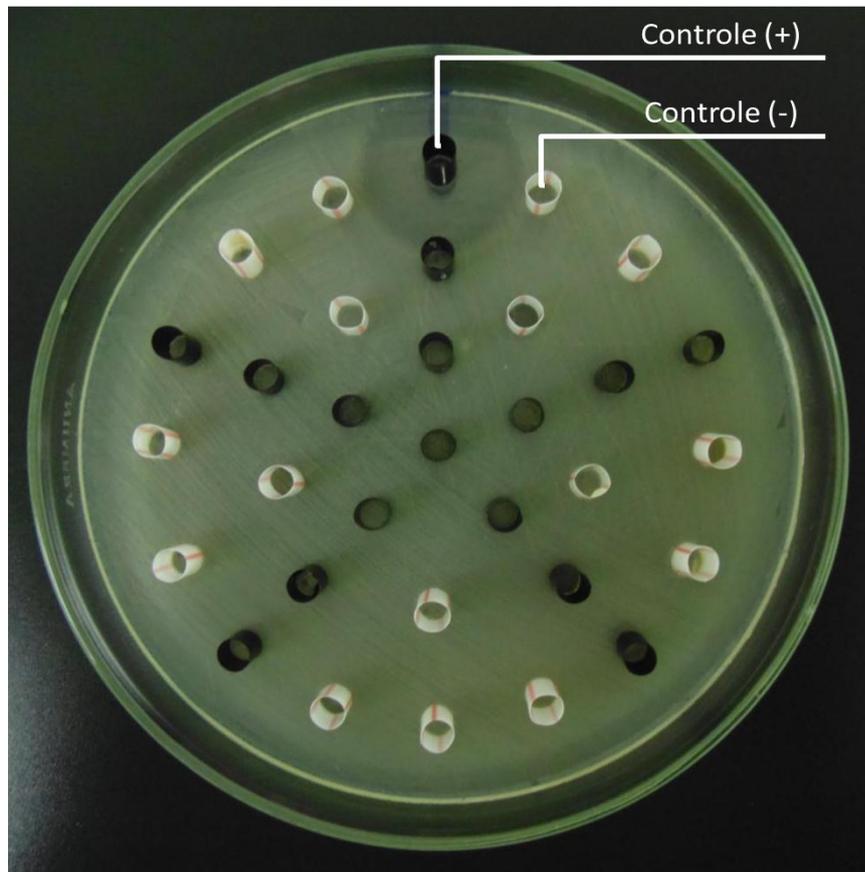
O HTS foi desenvolvido originalmente pela indústria farmacêutica, com a finalidade de descobrir novas substâncias bioativas em um curto espaço de tempo e com o menor dispêndio de recursos financeiros (GRIBBON; ANDREAS, 2005). Foi com o uso desses métodos que a indústria descobriu importantes compostos, por exemplo, os cientistas da *Merck Research Laboratories* fizeram uma triagem de mais de 250.000 compostos e identificaram uma nova classe de compostos supressores do vírus HIV, os *diketoacids*, que bloqueiam a integração do DNA viral no DNA de uma célula infectada (HAZUDA et al., 2000). Vantagens estão associadas ao uso do HTS em estudos de prospecção de compostos bioativos. Ao longo dos últimos anos esta inovação tecnológica permitiu a estruturação e expansão das coleções de compostos químicos em base de dados, como aquelas da empresa

*Pfizer Bill Steere*. Esta empresa adicionou mais de dois milhões de compostos químicos novos em sua base de dados devido ao método HTS (GOLEBIOWSKI; KLOPFENSTEIN; PORTLOCK, 2001).

Entretanto, o HTS apresenta algumas limitações no seu uso, como por exemplo o estudo de misturas de compostos, onde o HTS pode acusar atividade em um determinado extrato bruto, porém, essa atividade pode ser devida ao sinergismo de dois ou mais compostos presentes no extrato. Em etapas posteriores de purificação, as frações podem não mais apresentar a atividade observada no extrato bruto. Nesse sentido, o extrato inicialmente positivo foi levado à etapas posteriores, o que ocasionou um gasto financeiro e de tempo no trabalho dessas amostras sem necessidade. Além desse aspecto, pode-se citar a ocorrência de resultados falso-negativos. Misturas de compostos podem conter uma substância bioativa, cuja ação é inibida pela presença de outras substâncias na mistura. O conjunto de substâncias sob certas condições e concentrações podem formar um agregado ocasionando a inibição mútua (LOMBARDINO, LOWE, 2004; THORNE, AULD, INGLESE, 2010).

Com o intuito de agregar informações sobre o potencial biotecnológico do acervo da CRM-UNESP, um dos objetivos do presente estudo foi o de implantar um método de alto desempenho para triar isolados de fungos produtores de compostos antimicrobianos. Levando em consideração as vantagens e desvantagens do HTS, procuramos adaptar um método rápido e de baixo custo para realizar as triagens (Figura 2). Métodos de HTS geralmente são difíceis de serem empregados para fungos filamentosos, devido a natureza do crescimento desses micro-organismos, necessitando cultivar os fungos em separado.

Figura 2. Esquema do ensaio microbiológico realizado pelo método de difusão em ágar. Após inocular a suspensão padronizada do micro-organismo de referência, canudos de plástico estéreis foram dispostos com espaçamento de 1,5 cm x 1,5 cm. A figura também representa a disposição dos controle positivo (solução de antibiótico) e negativo (somente meio de cultivo) nos ensaios.



### 3 OBJETIVOS

- Curar e autenticar parte do acervo de fungos filamentosos da CRM-UNESP, caracterizando os isolados com base em ferramentas moleculares.
- Avaliar a produção de compostos antimicrobianos de fungos depositados no acervo de pesquisa da CRM-UNESP.
- Implementar na rotina da coleção um método de triagem molecular (*fingerprinting* genético)
- Implementar na rotina da coleção um método de triagem de alto desempenho para detecção de isolados produtores de substâncias antimicrobianas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Origem e reativação dos isolados

Um total de 215 isolados de fungos filamentosos mantidos no acervo de pesquisa da CRM-UNESP foi avaliado (ver detalhes no item 5.1, o motivo pelo qual 201 fungos foram utilizados nos ensaios). Esse montante de isolados foi selecionado dentre 5.970 fungos mantidos no acervo de pesquisa, buscando abranger a maior diversidade de fontes de isolamento desses fungos, a saber: jardins de fungo de formigas da tribo Attini (n= 79 isolados), tecido interno de folhas (fungos endofíticos, n= 65), filoplano (superfície das folhas, n= 39), solo (n= 7), exoesqueleto de formiga da tribo Attini (n= 6) e compostagem (n= 5). A maioria dos isolados estava identificados até gênero ou não apresentava identificação taxonômica, motivo pelo qual fazem parte do acervo de pesquisa da coleção.

Os fungos estão criopreservados na CRM-UNESP a - 80 °C, em glicerol 10%. Os isolados foram reativados para verificação das condições de viabilidade e pureza das culturas. A reativação foi realizada em meio Ágar Malte 2% (MA2%, Acumedia) suplementado com 30 µg mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol (Sigma). As placas foram incubadas a 25 °C, durante sete dias, no escuro. Após o período de incubação, os fungos foram transferidos para uma segunda placa contendo MA2% (sem antibiótico) para checar a pureza e a viabilidade das culturas. Tal checagem foi realizada examinando as características macroscópicas, microscópicas, bem como a viabilidade celular das colônias de todos os isolados.

### 4.2 Identificação dos fungos

A identificação dos isolados seguiu a seguinte linha de trabalho: (i) todos os isolados foram inicialmente submetidos a uma triagem utilizando a técnica de MSP-PCR (*microsatellite-primed PCR*), proposta por Meyer et al. (1993). Tal técnica foi originalmente empregada para discriminar isolados de leveduras, contudo, no presente trabalho, a intenção era a de adaptar o MSP-PCR com a finalidade de agrupar os isolados de fungos filamentosos que apresentem o mesmo perfil de banda. Posteriormente, (ii) pelo menos um isolado representante de cada perfil obtido no MSP-PCR e todos os isolados que não apresentaram padrões de bandas semelhantes foram selecionados para sequenciamento de DNA e identificação dos fungos.

O DNA genômico dos isolados foi extraído utilizando o método CTAB (cetiltrimetil brometo de amônio) proposto por Moeller et al. (1992), Gerardo et al. (2004) e modificado por Rodrigues et al. (2009). Para realização do MSP-PCR, o DNA genômico foi amplificado utilizando o *primer* (GAC)<sub>5</sub>. As reações em cadeia de polimerase (PCR) continham (em 25,0 µL de volume final) : 4,0 µL de dNTPs (1,25 mM cada), 2,5 µL de tampão 10x, 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,2 µL de Taq polimerase (5,0 U µl<sup>-1</sup>), 2,0 µL de (GAC)<sub>5</sub> (10 mM), 10,3 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura e 5,0 µL de DNA diluído (1:750). As condições de PCR foram: 95 °C durante 3 min, 40 ciclos a 93 °C durante 45 s, 50 °C durante 60 s, 72 °C durante 60 s, e de extensão final a 72 °C durante 6 min. Os amplicons foram separados com eletroforese em gel de agarose 1,4%, em TBE (0,5 %) a 110 V, durante 2 h. Os padrões de bandas foram visualizados em UV após coloração com a solução de *GelRed*<sup>TM</sup> (Biotium) 16% e NaCl 0,56%.

Considerando o código de barras de DNA universal para fungos (SCHOCH et al., 2012), a região ITS (*internal transcribed spacer*) do rDNA foi utilizada na amplificação dos isolados. Os *primers* ITS4 e ITS5 foram selecionados para essa região (Tabela 1). As reações de amplificação com 25 µL de volume final consistiram em: 0,2 mM de cada dNTP, 10x de tampão KCl, 10 mg mL<sup>-1</sup> de BSA, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada *primer* e 1U da enzima *Taq polimerase* (reagentes - Promega). As condições de PCR foram: 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min e 72 °C durante 2 min. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados sob UV, em transluminador, após coloração com *GelRed*<sup>TM</sup> (Biotium). Após a confirmação dos amplicons, estes foram purificados com o kit *Wizard*<sup>®</sup> *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

Os amplicons purificados foram quantificados em *NanoDrop*<sup>®</sup> (Thermo Scientific) e, posteriormente, 20 ng µL<sup>-1</sup> de DNA foram preparados para o sequenciamento utilizando *BigDye Terminator*<sup>®</sup> v. 3.1 *Kit* (Life Technologies), segundo o protocolo do fabricante. Os produtos foram sequenciados em ABI 3330xl (Life Technologies). Ambas as sequências, *forward* e *reverse*, foram geradas e compiladas em *contigs* utilizando o software BioEdit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999).

A busca por sequências homólogas aos *contigs* obtidos no estudo foi realizada nos bancos de acesso público NCBI – GenBank através do aplicativo MegaBLAST, (ZHANG et al., 2000; MORGULIS et al., 2008) e CBS (www.cbs.knaw.nl). É sabido que para fungos dos gêneros *Penicillium* e *Trichoderma*, a região ITS não apresenta variabilidade intraespecífica

suficiente para resolver a separação em espécies. Considerando tal limitação do *barcode* para esses gêneros, utilizamos nesse trabalho outros marcadores que apresentam maior variabilidade intraespecífica (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* utilizados na amplificação de marcadores para identificação dos fungos do presente estudo.

<b>Primer</b>	<b>Sentido</b>	<b>Sequência (5'&gt;3')</b>	<b>Referência</b>
ITS4	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
ITS5	F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al. (1990)
EF1-728F	F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Carbone e Kohn (1999)
TEF 1R	R	GCCATCCTTGGAGATACCAGC	Samuels et al. (1999)
β t2a	F	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass e Donaldson (1995)
β t2b	R	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Glass e Donaldson (1995)
(GAC) <sub>5</sub>	MSP	GACGACGACGACGAC	Meyer et al. (1993)

F: *forward*; R: *reverse*; MSP: *microsatellite-primed*

### 4.3 Ensaios de atividade antimicrobiana

#### 4.3.1 Preparação dos cultivos

As culturas axênicas foram inoculadas em placas contendo MA2% e incubadas durante sete dias, a 25 °C. Posteriormente, com auxílio de um furador de rolhas estéril, foram removidos três fragmentos (6 mm de diâmetro) do micélio de cada fungo e transferidos para Erlenmeyers contendo 50 mL de caldo batata-dextrose (Himedia). Os frascos foram incubados a 25 °C, durante oito dias, em agitação (120 rpm).

Após incubação, o meio de cultivo foi transferido para tubo de centrifugação estéril (50 mL) e centrifugado a 10.000 rpm, durante 10 minutos. Aproximadamente 25 mL do sobrenadante foi separado em um outro tubo de centrifugação, congelado a -80 °C e, posteriormente, liofilizado durante 24 horas. A massa obtida foi suspensa em 5 mL de água ultrapura, sendo este considerado o cultivo bruto. Tais cultivos foram armazenados a -80 °C até a realização dos ensaios.

#### 4.3.2 Linhagens de referência utilizadas nos ensaios

Para verificar a ação antimicrobiana dos cultivos foram utilizadas linhagens microbianas de referência, a saber: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida*

*parapsilosis* ATCC 22019. Adicionalmente, para investigar o potencial dos fungos em produzir substâncias que atuem também em micro-organismos de interesse agrícola, foi utilizada nos ensaios a bactéria causadora do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* linhagem 306. Essa linhagem foi utilizada em vários estudos sobre genética bacteriana e foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira, coordenador do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB, UNESP, Rio Claro), o qual está autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a manipular esta praga quarentenária.

Todas as linhagens de interesse clínico e agrícola estão mantidas na CRM-UNESP: *Xac* em glicerol 40% e as demais em glicerol 15%, a -80 °C. As bactérias foram reativadas em meio Ágar Nutriente (Acumedia) e incubadas a 37 °C, durante 24 horas, com exceção da *Xac*, a qual foi incubada a 25 °C, durante 48 horas. No caso das leveduras, as linhagens foram reativadas em meio Ágar Sabouraud-Dextrose (Acumedia) e incubadas a 25 °C, durante 48 horas. A pureza de todas as culturas foi avaliada após o período de incubação, através de estrias de esgotamento e observação das características morfológicas.

#### 4.3.3 Padronização das suspensões das linhagens de referência

As suspensões bacterianas de *S. aureus* e *E. coli* foram padronizadas a partir de cultivos de 24 horas e, no caso da *Xac*, a partir de cultivo de 48 horas em meio Ágar Nutriente. As células bacterianas foram suspendidas individualmente em solução salina estéril (NaCl 0,85%) até atingir turvação compatível à escala 0,5 de McFarland (a qual corresponde aproximadamente a  $1,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) (CLSI, 2006).

As suspensões das leveduras foram padronizadas a partir de cultivos de 48 horas em meio Ágar Sabouraud. As células das leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* foram suspendidas em solução salina estéril (NaCl 0,85%), na concentração de  $5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, sendo que a contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer (Bright-Line, Precicolor, HBG, Germany; CLSI, 2008).

#### 4.3.4 Ensaios com os cultivos brutos

Os cultivos brutos de todos os isolados foram submetidos a uma triagem de alto desempenho (*high-throughput screening* ou HTS) para seleção daqueles com atividade antimicrobiana frente as bactérias e fungos. O ensaio foi realizado segundo método descrito na UNITED STATES PHARMACOPEIA (1975), com modificações implantadas nesse

estudo: ao invés de cilindros de metal, foram utilizados canudos de plástico para incorporar os cultivos no meio. Em placas de Petri (120 x 15 mm) contendo meio Ágar Mueller-Hinton (para bactérias) ou Ágar Sabouraud (para leveduras), as suspensões microbianas padronizadas (conforme item 4.3.3) foram semeadas utilizando *swab* estéril. O inóculo foi realizado de forma a recobrir todo o meio de cultivo de forma homogênea.

Após a inoculação, as placas foram mantidas em repouso na cabine de segurança biológica durante 10 minutos e, em seguida, foram dispostos 32 canudos de plástico estéreis, com espaçamento de 1,5 cm um do outro (Figura 2). Aliquotas de 30  $\mu\text{L}$  de cada cultivo bruto (item 4.3.1) foram aplicadas nos canudos. Posteriormente, as placas foram incubadas a 25 °C, durante 48 horas, para as leveduras; e a 37 °C, durante 24 horas, para as bactérias e 48 horas no caso da *Xac*.

Como controle positivo foram utilizados 30  $\mu\text{L}$  de cloranfenicol a 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Sigma) para a *E. coli* e *S. aureus*; 30  $\mu\text{L}$  de kanamicina a 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *Xac* e 30  $\mu\text{L}$  de nistatina a 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para as leveduras. Foram considerados com ação inibitória as amostras que apresentaram halo de inibição  $\geq 6$  mm. Também foi realizado um controle negativo do teste, o qual consistiu em um canudo no qual foi inoculado o meio de cultura líquido estéril. Os halos foram medidos com o auxílio de um paquímetro e todos os testes foram realizados em duplicata.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Reativação dos isolados

Do total de 215 isolados selecionados para o presente estudo, 201 foram reativados com sucesso. Os 14 (6,5 %) isolados restantes foram considerados inviáveis, pois não cresceram após a reativação e provavelmente não sobreviveram ao longo tempo de armazenamento nas condições aplicadas. Os tubos de criopreservação desses isolados datam de meados de 2008.

Do total de 201 isolados, a pureza das culturas foi confirmada para 196 isolados. Os cinco isolados remanescentes apresentaram sinais de contaminação com bactérias e outros fungos. Tais isolados foram purificados com sucesso pelo método de cultura monospórica e o estoque original no -80 °C foi substituído por um novo lote contendo as culturas puras.

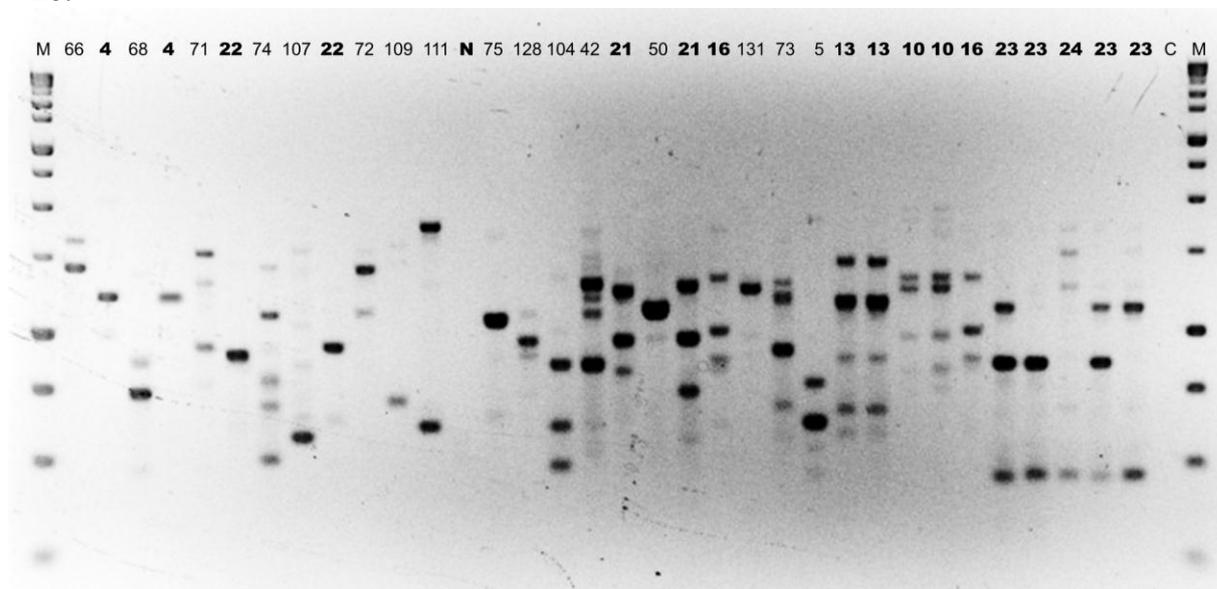
### 5.2 Triagem e identificação dos isolados

O DNA genômico dos isolados foi amplificado com sucesso utilizando a técnica de MSP-PCR. Não foi possível obter os perfis de bandas de apenas seis dentre os 201 isolados avaliados devido à falhas na amplificação. O *primer* empregado no MSP-PCR gerou vários perfis de bandas polimórficos (Figura 3), possibilitando o reconhecimento de 110 perfis com apenas um isolado cada (considerados perfis únicos) e 26 perfis de bandas com mais de um isolado cada (Figura 3, Apêndice A).

Nas etapas subsequentes de identificação, foram selecionados para o sequenciamento isolados que apresentavam perfis únicos de banda e os representativos dos perfis de bandas que compartilhavam mais de um isolado. Portanto, neste trabalho foi sequenciado um total de 150 isolados, já contando os seis isolados não amplificados pelo microsatélite (Apêndice A).

No geral a técnica de triagem possibilitou reduzir o número de isolados a serem sequenciados, pois de um total de 201 isolados, 150 foram submetidos ao sequenciamento de DNA.

Figura 3. Perfis de bandas de fungos filamentosos obtidos pela técnica de microsatélites (MSP-PCR). Os números representam os perfis de bandas de cada fungo obtidos com o *primer* (GAC)<sub>5</sub>. As linhas nas extremidades correspondem ao marcador de peso molecular de 1 kb.



M: Marcador de peso molecular de 1 kb; C: Controle negativo; N: ausência de perfil de banda (amplificação não funcionou). Os números correspondem aos perfis de bandas de cada fungo, os quais estão representados no Apêndice A. Números em negrito correspondem aos isolados que compartilham o mesmo perfil de bandas, já os números sem negrito correspondem aos fungos com perfis únicos.

Após o sequenciamento da região *barcode* (e de outras regiões do genoma, no caso de *Trichoderma* e *Penicillium*) foi possível identificar 189 isolados do total de 201 selecionados do acervo de pesquisa da CRM-UNESP. Os demais isolados (n= 12) não foram identificados.

A abordagem polifásica de identificação utilizada no presente estudo possibilitou a identificação de 66 gêneros e 116 espécies (Apêndices A e B). Do total de 189 isolados, 13, 15 e 161 pertencem aos filos “Zygomycota”, Basidiomycota e Ascomycota, respectivamente (Tabela 2). Os gêneros mais abundantes examinados nesse estudo foram: *Fusarium* (18,9%), *Clonostachys* (11,4%), *Trichoderma* (7%) e *Penicillium* (6,5% Tabela 2, Apêndice B).

Tabela 2. Gêneros de fungos filamentosos identificados no presente estudo e a respectiva classificação taxonômica no Reino Fungi.

<b>Gênero</b>	<b>Filo</b>	<b>N<sup>1</sup></b>	<b>Gênero</b>	<b>Filo</b>	<b>N</b>
<i>Aaosphaeria</i>	Ascomycota	1	<i>Ochroconis</i>	Ascomycota	1
<i>Absidia</i>	“Zygomycota”	1	<i>Oidiodendron</i>	Ascomycota	1
<i>Acremonium</i>	Ascomycota	1	<i>Oudemansiella</i>	Basidiomycota	1
<i>Acrocalymma</i>	Ascomycota	1	<i>Paecilomyces</i>	Ascomycota	1
<i>Agaricus</i>	Basidiomycota	2	<i>Paraconiothyrium</i>	Ascomycota	1
<i>Albonectria</i>	Ascomycota	4	<i>Paraphaeosphaeria</i>	Ascomycota	1
<i>Alternaria</i>	Ascomycota	1	<i>Penicillium</i>	Ascomycota	13
<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	3	<i>Peniophora</i>	Basidiomycota	1
<i>Bartalinia</i>	Ascomycota	1	<i>Periconia</i>	Ascomycota	2
<i>Beauveria</i>	Ascomycota	1	<i>Pestalotiopsis</i>	Ascomycota	5
<i>Byssochlamys</i>	Ascomycota	1	<i>Peyronellaea</i>	Ascomycota	1
<i>Ceriporiopsis</i>	Basidiomycota	1	<i>Phaeosphaeria</i>	Ascomycota	2
<i>Cladosporium</i>	Ascomycota	3	<i>Phaeosphaeriopsis</i>	Ascomycota	1
<i>Clonostachys</i>	Ascomycota	23	<i>Phanerochaete</i>	Basidiomycota	2
<i>Colletotrichum</i>	Ascomycota	2	<i>Phlebia</i>	Basidiomycota	2
<i>Corynespora</i>	Ascomycota	1	<i>Phoma</i>	Ascomycota	1
<i>Cunninghamella</i>	“Zygomycota”	3	<i>Phomopsis</i>	Ascomycota	2
<i>Cytospora</i>	Ascomycota	1	<i>Pithomyces</i>	Ascomycota	2
<i>Diaporthe</i>	Ascomycota	2	<i>Pochonia</i>	Ascomycota	1
<i>Epicoccum</i>	Ascomycota	2	<i>Purpureocillium</i>	Ascomycota	2
<i>Escovopsioides</i>	Ascomycota	1	<i>Rhizomucor</i>	“Zygomycota”	1
<i>Escovopsis</i>	Ascomycota	1	<i>Rhizopus</i>	“Zygomycota”	1
<i>Fomitella</i>	Basidiomycota	2	<i>Schizophyllum</i>	Basidiomycota	2
<i>Fusarium</i>	Ascomycota	38	<i>Scopulariopsis</i>	Ascomycota	1
<i>Guignardia</i>	Ascomycota	3	<i>Scytalidium</i>	Ascomycota	2
<i>Hendersonia</i>	Ascomycota	1	<i>Setophoma</i>	Ascomycota	1
<i>Lichtheimia</i>	“Zygomycota”	1	<i>Syncephalastrum</i>	“Zygomycota”	1
<i>Lophiostoma</i>	Ascomycota	2	<i>Talaromyces</i>	Ascomycota	3
<i>Marasmius</i>	Basidiomycota	1	<i>Thermomyces</i>	Ascomycota	1
<i>Mariannaea</i>	Ascomycota	1	<i>Trametes</i>	Basidiomycota	1
<i>Mucor</i>	“Zygomycota”	4	<i>Trichoderma</i>	Ascomycota	14
<i>Myceliophthora</i>	Ascomycota	1	<i>Umbelopsis</i>	“Zygomycota”	1
<i>Neofusicoccum</i>	Ascomycota	1	<i>Xylaria</i>	Ascomycota	5
FNI <sup>2</sup>		12			
<b>Total</b>		124			77

<sup>1</sup> Número de isolados pertencente a cada gênero.

<sup>2</sup> FNI: Fungos não identificados.

### 5.3 Ensaios para determinação da atividade antimicrobiana

Foram produzidos 201 cultivos para realização dos ensaios de triagem e determinação da propriedade antimicrobiana frente aos seis micro-organismos de referência (item 4.3.2). Dentre os cultivos avaliados, 75 (37,3 % do total) não inibiram o crescimento de nenhuma bactéria ou levedura de referência (Figura 4). Por outro lado, a maioria dos cultivos (62,7 %, n= 126) inibiu o crescimento de, pelo menos, um dos micro-organismos de

referência. Cinco (2,5 %) cultivos apresentaram amplo espectro de ação, pois formaram halos de inibição frente aos seis micro-organismos de referência (Figura 4). Tais cultivos brutos foram produzidos pelos fungos: *Clonostachys rosea* LESF 389, *Penicillium aurantiogriseum* LESF 194, fungo não identificado LESF 227, *Penicillium dodgei* LESF 487 e *Xylaria* sp. 4 LESF 502 (Tabela 3).

Figura 4. Porcentagem de cultivos brutos com atividade antimicrobiana (total N= 201), obtidos de isolados de fungos filamentosos mantidos no acervo de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP. O eixo x corresponde ao número de micro-organismos inibidos, sendo seis o número total de micro-organismos de referência utilizados.

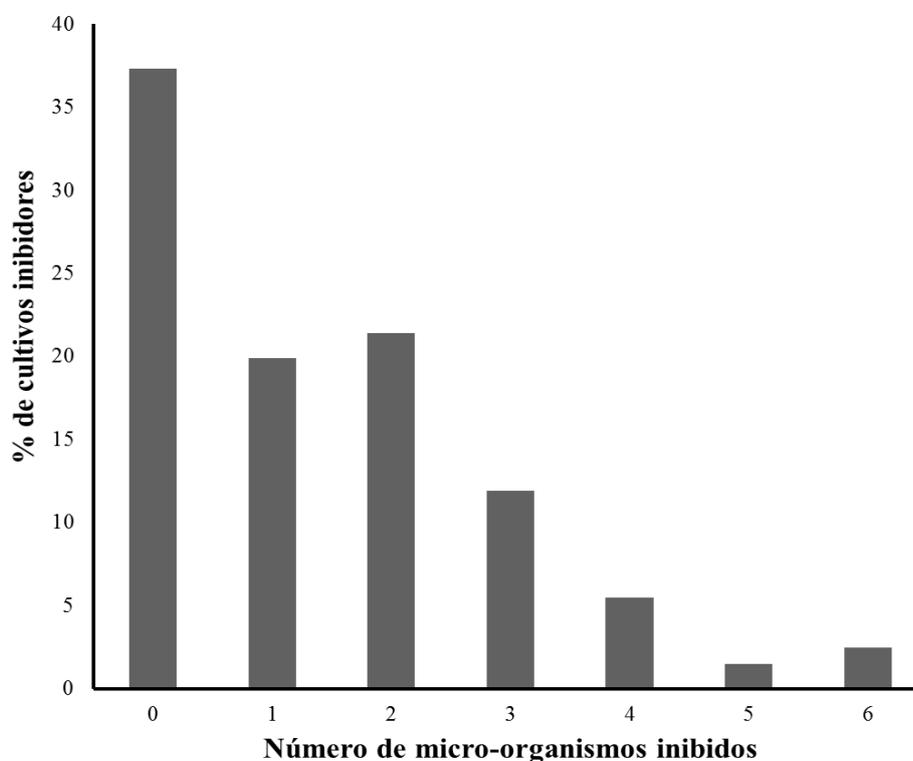


Tabela 3. Resultado qualitativo do diâmetro (em mm) do halo de inibição do crescimento de linhagens de referência frente a 201 cultivos brutos produzidos por fungos mantidos no acervo de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP.

Código	Bactérias			Leveduras			Identificação
	<i>X. citri</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	
LESF 054	6-	.	.	6---	.	6---	<i>Escovopsis</i> sp.
LESF 114	.	.	.	.	.	6--	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex
LESF 116	.	.	7	6-	6--	.	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex
LESF 133	.	.	.	6--	6---	6--	<i>Hendersonia</i> sp.
LESF 168	.	.	.	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 180	.	.	.	6---	.	.	<i>Syncephalastrum</i> sp.
LESF 188	14	6-	.	6---	.	6-	<i>Penicillium</i> sp. 5
LESF 191	.	.	.	6---	.	.	<i>Schizophyllum commune</i>
LESF 192	.	.	.	6--	.	6-	<i>Aspergillus</i> sp.
LESF 193	.	.	6	.	.	.	<i>Penicillium canescens</i>
LESF 194	17	14-	16-	6	6--	6	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>
LESF 198	.	.	.	.	.	.	<i>Lophiostoma</i> sp.
LESF 199	6---	.	.	6--	6---	6-	FNI
LESF 200	.	.	.	6---	.	6---	<i>Penicillium waksmanii</i>
LESF 202	.	.	.	.	.	6-	<i>Penicillium spinulosum</i>
LESF 203	.	.	.	6-	.	6	<i>Ochroconis cordanae</i>
LESF 204	18	.	7	6---	.	6--	<i>Talaromyces funiculosus</i>
LESF 205	.	.	.	.	.	.	FNI
LESF 212	.	.	.	6--	.	6-	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
LESF 213	.	.	.	.	.	.	<i>Penicillium</i> sp. 1
LESF 214	.	.	.	10	.	.	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex
LESF 227	6	6	6	6-	6-	6	Dothideomycetes
LESF 236	.	.	12	6---	.	6--	<i>Trichoderma</i> sp.
LESF 337	.	.	.	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 344	.	.	.	.	.	.	<i>Trichoderma harzianum</i>
LESF 347	6-	.	.	.	.	.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
LESF 366	.	.	.	.	.	.	<i>Lichtheimia ramosa</i>
LESF 367	.	.	7	.	.	6	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
LESF 368	6---	.	7	6---	6--	6---	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 369	.	.	8	.	7--	.	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
LESF 370	6---	.	9	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 371	.	.	6	6---	.	.	<i>Fusarium polyphialidicum</i>
LESF 372	.	.	8	6---	8---	.	<i>Fusarium</i> sp.2
LESF 373	.	.	.	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 374	6-	.	7	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 375	.	.	18--	.	.	.	<i>Aspergillus fumigatus</i>
LESF 376	.	.	6--	6---	.	.	<i>Acroclymma medicaginis</i>
LESF 377	.	.	6	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 378	.	.	.	6---	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 379	6-	.	16	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 380	.	.	6	6---	.	.	<i>Fusarium proliferatum</i>
LESF 381	.	.	.	.	.	.	<i>Colletotrichum</i> sp.
LESF 382	6-	.	10	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>

LESF 383	.	.	6--	.	.	6---	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 384	6	.	7	6--	10	7-	<i>Fusarium</i> sp. 1
LESF 385	.	.	.	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 386	.	.	8	6-	.	6---	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 387	.	.	15-	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 388	.	.	.	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 389	12-	11	19	6-	6--	9--	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 390	.	.	.	.	.	.	<i>Phomopsis</i> sp. 1
LESF 391	6-	.	9	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 392	.	.	.	6---	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 393	.	.	.	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 394	.	.	.	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 395	.	.	.	.	.	.	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
LESF 396	7-	6-	14	6--	.	8--	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 397	.	.	16---	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 398	.	.	.	.	.	6---	<i>Fusarium</i> sp. 2
LESF 399	.	.	19 -	.	.	6---	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 400	.	.	.	.	.	.	<i>Colletotrichum</i> sp.
LESF 401	15--	.	22	.	.	.	<i>Aspergillus fumigatus</i>
LESF 402	.	.	6--	.	.	.	FNI
LESF 403	.	.	.	.	.	.	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
LESF 404	.	.	.	.	.	.	<i>Phomopsis</i> sp. 2
LESF 405	.	.	27--	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 406	.	.	.	.	.	.	<i>Fusarium</i> sp. 4
LESF 407	.	.	.	.	13--	6--	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 408	.	.	.	.	.	.	<i>Fusarium</i> sp. 4
LESF 409	.	.	.	.	.	.	<i>Fusarium</i> sp. 3
LESF 410	.	.	.	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 411	.	.	9--	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 412	.	.	.	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 413	.	.	8	.	.	.	<i>Fusarium</i> sp. 1
LESF 414	.	.	6--	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 415	.	.	.	.	.	.	<i>Fusarium</i> sp. 5
LESF 416	.	.	.	6---	.	.	<i>Diaporthe</i> sp.
LESF 417	.	.	.	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 418	.	.	30---	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 419	.	.	.	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 420	.	.	.	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 421	.	.	.	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 422	.	.	6---	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 423	.	.	6--	6---	.	.	<i>Fusarium</i> sp. 3
LESF 424	.	.	.	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 425	.	.	.	.	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 426	.	.	19-	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 427	.	.	.	6-	.	12-	FNI
LESF 428	.	.	.	6---	.	6---	<i>Xylaria</i> sp. 1
LESF 429	.	.	.	.	.	.	<i>Fomitella supina</i>
LESF 430	.	.	.	6---	.	6---	<i>Peyronella coffeae-arabicae</i>

LESF 431	.	.	9	6--	7	6-	<i>Trichoderma deliquescens</i>
LESF 432	.	.	.	6--	.	6--	<i>Phanerochaete sordida</i>
LESF 433	.	.	.	.	.	.	<i>Rhizomucor variabilis</i>
LESF 434	.	.	.	.	.	6-	<i>Bartalinia pondoensis</i>
LESF 435	.	.	.	.	.	.	<i>Periconia byssoides</i>
LESF 436	.	.	.	.	.	.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
LESF 437	.	.	8	.	.	.	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex
LESF 438	.	.	.	.	.	6--	<i>Talaromyces</i> sp.
LESF 439	.	.	.	.	.	.	<i>Mucor</i> sp.
LESF 440	.	.	8	.	.	.	<i>Penicillium citrinum</i>
LESF 441	12	16-	16	.	.	6-	<i>Penicillium rolfsii</i>
LESF 442	6--	.	6	6-	.	6---	<i>Clonostachys rosea</i>
LESF 443	.	.	10	6	6--	6--	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex
LESF 444	6	.	.	.	.	.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
LESF 445	.	.	.	.	.	.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
LESF 446	.	.	.	.	.	.	<i>Mucor</i> sp.
LESF 447	.	.	.	6--	.	6-	<i>Penicillium</i> sp. 2
LESF 448	.	.	6	6-	6	6	<i>Fusarium</i> sp. 1
LESF 449	.	.	.	.	.	.	<i>Fusarium solani</i> species complex
LESF 450	6--	.	9	.	.	.	<i>Trichoderma harzianum</i>
LESF 451	.	.	.	6---	.	6--	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
LESF 452	.	.	.	.	.	6--	<i>Acremonium</i> sp.
LESF 453	.	.	.	.	.	.	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>
LESF 454	.	.	.	.	.	.	FNI
LESF 455	.	.	.	.	.	.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
LESF 456	.	.	.	.	.	.	<i>Trichoderma</i> sp.
LESF 457	.	.	.	.	.	.	<i>Xylaria</i> sp. 2
LESF 458	6	.	.	6-	.	.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
LESF 459	.	.	.	6-	.	6--	<i>Trichoderma</i> cf. <i>strigosum</i>
LESF 460	.	.	.	6-	.	6--	<i>Trichoderma</i> cf. <i>strigosum</i>
LESF 461	.	.	.	6--	.	.	<i>Periconia byssoides</i>
LESF 462	6--	.	.	6-	.	6--	<i>Phanerochaete sordida</i>
LESF 463	.	.	.	.	.	.	<i>Diaporthe endophytica</i>
LESF 464	.	.	.	.	.	.	<i>Aaosphaeria</i> sp.
LESF 465	.	.	.	6-	.	6-	FNI
LESF 466	.	.	.	.	.	.	FNI
LESF 467	.	.	.	.	.	.	<i>Lophiostoma</i> sp.
LESF 468	.	.	.	.	.	.	<i>Alternaria alternata</i>
LESF 469	.	6---	.	.	.	.	<i>Cladosporium</i> sp.
LESF 470	.	.	.	6--	.	6--	FNI
LESF 471	6--	.	.	6-	.	6-	<i>Scytalidium</i> sp.
LESF 472	.	.	.	.	.	.	<i>Pithomyces chartarum</i>
LESF 473	.	.	.	6-	6---	6-	<i>Xylaria</i> sp. 3
LESF 474	.	.	.	.	.	.	<i>Xylaria</i> sp. 3
LESF 475	6---	.	.	.	.	6--	FNI
LESF 476	.	.	.	.	.	.	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
LESF 477	6---	.	.	.	6-	6--	<i>Beauveria bassiana</i>
LESF 478	.	.	.	.	.	.	<i>Purpureocillium lilacinum</i>

LESF 479	.	.	10	6---	.	.	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex
LESF 480	.	.	.	.	.	.	<i>Scopulariopsis</i> sp.
LESF 481	.	.	.	.	.	.	<i>Escovopsioides nivea</i>
LESF 482	.	.	.	.	.	.	<i>Cunninghamella echinulata</i>
LESF 483	.	.	.	.	.	6---	<i>Pithomyces</i> sp.
LESF 484	.	.	.	.	.	.	<i>Penicillium simplicissimum</i>
LESF 485	.	.	.	6---	.	6---	<i>Phoma</i> sp.
LESF 486	.	6	6	.	.	6-	<i>Paecilomyces victoriae</i>
LESF 487	6	6	6	6	6	6	<i>Penicillium dodgei</i>
LESF 488	.	.	.	.	.	.	<i>Absidia</i> sp.
LESF 489	.	.	.	6---	.	6---	<i>Cunninghamella</i> sp. 2
LESF 490	.	.	.	6---	.	6--	<i>Mucor hiemalis</i>
LESF 491	6	.	.	6---	.	6---	<i>Cytospora eucalypticola</i>
LESF 492	13	8	11	.	.	.	<i>Epicoccum nigrum</i>
LESF 493	.	.	.	6---	.	6---	<i>Epicoccum sorghi</i>
LESF 494	.	.	.	.	.	.	<i>Guignardia mangiferae</i>
LESF 495	.	.	.	.	.	6--	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>
LESF 496	.	.	.	.	.	.	<i>Oidiodendron</i> sp.
LESF 497	.	.	6	.	.	.	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>
LESF 498	.	.	.	.	.	.	<i>Phaeosphaeria herpotrichoides</i>
LESF 499	.	.	.	.	6--	6-	<i>Phaeosphaeria</i> sp.
LESF 500	6--	.	8	.	.	6	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.
LESF 501	.	.	.	.	.	.	<i>Setophoma chromolaena</i>
LESF 502	6	6-	6--	6	6	6	<i>Xylaria</i> sp. 4
LESF 503	.	.	.	.	.	.	<i>Agaricus fiardii</i>
LESF 504	.	.	6-	6---	.	6---	<i>Oudemansiella canarii</i>
LESF 505	.	.	.	.	.	.	<i>Peniophora crassitunicata</i>
LESF 506	.	.	.	6---	.	6---	<i>Phlebia subserialis</i>
LESF 507	.	6---	.	6--	.	6-	<i>Trametes hirsuta</i>
LESF 508	.	.	.	6-	.	.	<i>Mucor parvisseptatus</i>
LESF 509	.	.	.	.	.	.	<i>Umbelopsis nana</i>
LESF 510	.	.	.	.	.	.	FNI
LESF 511	6	.	6-	.	.	.	<i>Talaromyces muroii</i>
LESF 512	.	.	6	.	.	.	<i>Penicillium</i> sp. 3
LESF 513	6-	.	6	.	.	6-	<i>Penicillium</i> sp. 4
LESF 514	6	17-	30	.	.	.	<i>Trichoderma virens</i>
LESF 515	.	.	.	6--	6--	6-	<i>Trichoderma spirale</i>
LESF 516	.	.	6	6--	7-	6-	<i>Trichoderma orientale</i>
LESF 517	6	.	6	6---	.	6--	<i>Trichoderma harzianum</i>
LESF 518	.	.	.	.	.	.	<i>Agaricus fiardii</i>
LESF 521	.	6---	.	6--	.	6-	<i>Ceriporiopsis</i> sp.
LESF 522	6-	.	.	.	.	.	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex
LESF 541	.	.	.	6-	6-	6-	<i>Trichoderma andinense</i>
LESF 560	.	.	6	6-	6-	6	<i>Trichoderma andinense</i>
LESF 604	.	.	.	6--	.	8-	<i>Byssochlamys spectabilis</i>
LESF 605	.	.	8	.	.	.	<i>Clonostachys rogersoniana</i>
LESF 606	6--	.	.	6-	.	6-	<i>Fomitella supina</i>
LESF 607	.	.	.	6--	.	6--	<i>Corynespora cassicola</i>

LESF 608	.	.	.	.	.	.	<i>Cunninghamella</i> sp. 1
LESF 609	.	.	.	.	.	.	<i>Guignardia mangiferae</i>
LESF 610	.	.	.	.	.	.	<i>Guignardia mangiferae</i>
LESF 611	.	.	.	.	.	.	<i>Marasmius cladophyllus</i>
LESF 612	.	.	6	.	.	.	<i>Mariannaea elegans</i>
LESF 613	.	.	.	.	.	.	<i>Phlebia livida</i>
LESF 614	.	.	.	.	.	.	<i>Pochonia chlamydosporia</i>
LESF 615	.	.	.	.	.	6--	FNI
LESF 616	.	.	.	6--	.	6---	<i>Schizophyllum commune</i>
LESF 617	.	.	.	.	.	.	<i>Myceliophthora thermophila</i>
LESF 618	6	6	6	.	.	.	<i>Rhizopus microsporus</i>
LESF 619	.	.	.	.	.	.	<i>Scytalidium thermophilum</i>
LESF 620	.	.	.	.	.	.	<i>Thermomyces lanuginosus</i>
LESF 621	.	.	.	6---	.	.	<i>Clonostachys rosea</i>

∴ não apresentou halo de inibição; híffens: indicam a magnitude de crescimento de colônias dentro do halo de inibição (-: menor crescimento e ---: maior crescimento); FNI: Fungo não identificado; *X. citri*: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; *E. coli*: *Escherichia coli*; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. parapsilosis*: *Candida parapsilosis*; *C. albicans*: *Candida albicans*.

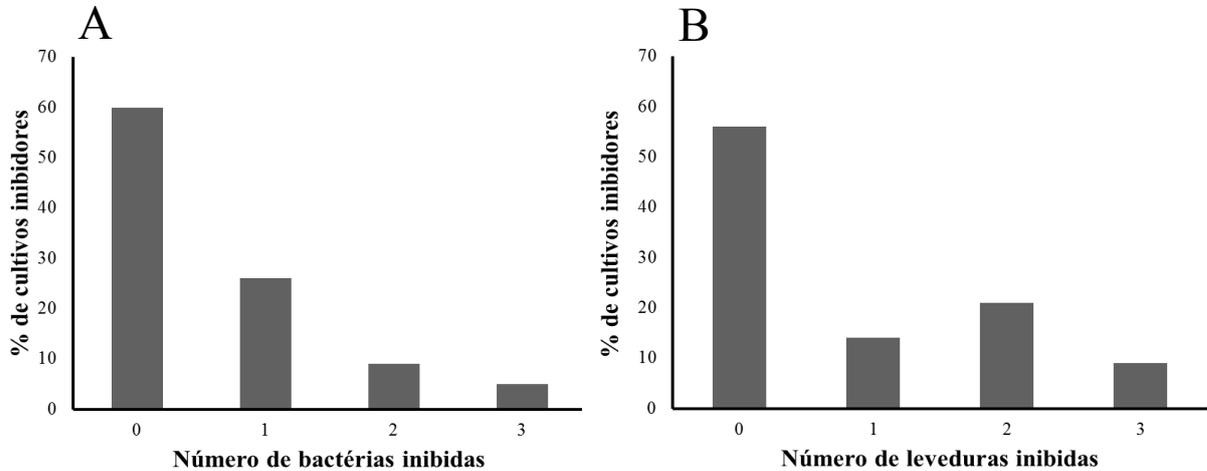
Da triagem de 201 cultivos brutos, 40% (n= 80) mostraram atividade contra as três bactérias, dos quais 26% (n= 53) inibiram apenas uma das bactérias de referência. Dentre este total de 53 cultivos, (n= 38) inibiram somente a *S. aureus*, (n= 12) a *Xac* e (n= 3) a *E. coli* (Figura 5a).

Em relação a atividade de amplo espectro entre as bactérias, 10 cultivos (5 %) inibiram as três bactérias de referência (Figura 5a), a saber: LESF 389, LESF 396, LESF 441, LESF 194, LESF 227, LESF 487, LESF 492, LESF 502, LESF 514 e LESF 618. O cultivo bruto proveniente do isolado *Trichoderma virens* LESF 514 apresentou o maior halo de inibição frente a *S. aureus* (30 mm de diâmetro, Figura 6a).

Considerando as leveduras, 46,3% (n= 93) dos cultivos brutos mostraram atividade inibitória frente a três leveduras, dos quais 16,4% (n= 33) inibiram apenas uma das leveduras de referência. Do total de 33 cultivos, (n= 17) inibiu somente a *C. albicans*, (n= 15) a *C. krusei* e (n= 1) a *C. parapsilosis*. (Figura 5b).

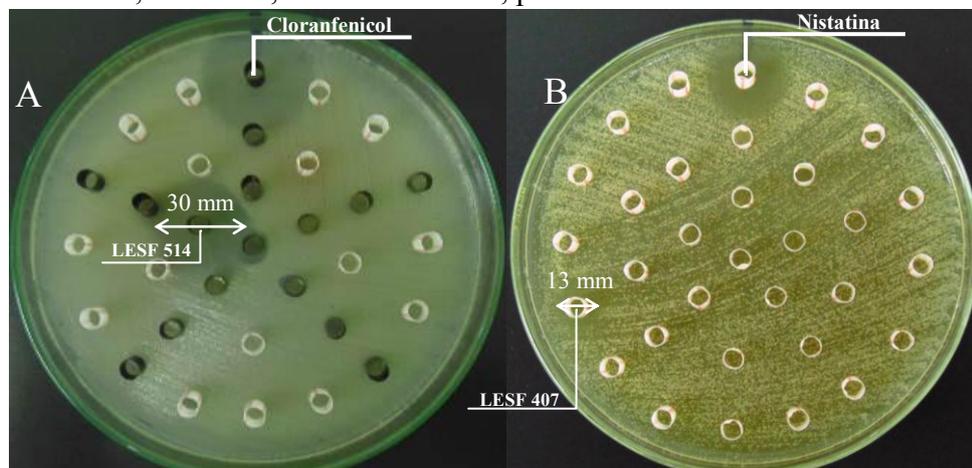
Em relação a atividade de amplo espectro entre as leveduras, 17 cultivos (8,5%) inibiram as três leveduras de referência (Figura 5b), a saber: LESF 368, LESF 384, LESF 389, LESF 431, LESF 443, LESF 448, LESF 473, LESF 133, LESF 194, LESF 199, LESF 227, LESF 487, LESF 541, LESF 560, LESF 502, LESF 515 e LESF 516. O cultivo proveniente do isolado *Clonostachys rosea* LESF 407 apresentou o maior halo de inibição frente a levedura *C. parapsilosis* (13 mm de diâmetro, Figura 6b).

Figura 5. Porcentagem de cultivos (N= 201 ) com atividade antimicrobiana em bactérias (A) e leveduras (B). Os cultivos foram obtidos de fungos mantidos no acervo de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP. O eixo x corresponde ao número de micro-organismos inibidos, sendo seis o número total de micro-organismos de referência utilizados.



Os micro-organismos de referência mais suscetíveis em relação a quantidade de fungos produtores de compostos bioativos com atividade antimicrobiana foram as linhagens *S. aureus*, *C. albicans* e *C. krusei*, sendo que *S. aureus* foi suscetível a um maior número de cultivos brutos com halos > 13 mm de diâmetro, quando comparado à *C. albicans* e *C. krusei* (Tabela 4). Os micro-organismos de referência menos suscetíveis foram *E. coli* e *C. parapsilosis* (Tabela 4).

Figura 6. Ensaio de ação antimicrobiana de cultivos de origem fúngica frente a bactéria *Staphylococcus aureus* (A) e a levedura *Candida parapsilosis* (B). O ensaio qualitativo foi realizado pelo método de difusão em ágar. As placas foram incubadas a 25 °C, durante 48 horas, para a levedura; e a 37 °C, durante 24 horas, para a bactéria.



LESF 514: *Trichoderma virens*; LESF 407 *Clonostachys rosea*

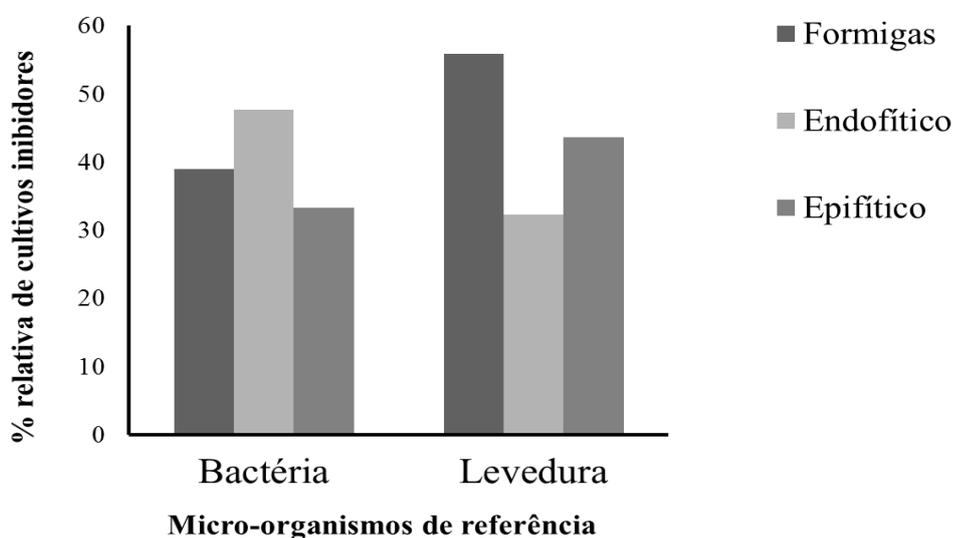
Tabela 4. Número absoluto de cultivos de origem fúngica que apresentaram ação antimicrobiana frente a bactérias e leveduras. O teste foi realizado com 201 cultivos produzidos por fungos do acervo de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP, através do método de difusão em ágar (halos de inibição). Diâmetros de inibição do controle também estão indicados.

Linhagens de referência	Nº de cultivos sem inibição	Halos de inibição (mm)			
		Controle	1 ≤ 6	7 ≤ 12	≥ 13
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	164	28 <sup>a</sup>	29	3	5
<i>Escherichia coli</i>	185	25 <sup>b</sup>	11	2	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	138	29 <sup>b</sup>	29	21	13
<i>Candida krusei</i>	131	18 <sup>c</sup>	70	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	177	20 <sup>c</sup>	18	5	1
<i>Candida albicans</i>	126	18 <sup>c</sup>	70	5	0

<sup>a</sup> Kanamicina; <sup>b</sup> Cloranfenicol; <sup>c</sup> Nistatina.

Quanto a ação antimicrobiana dos fungos em relação ao substrato de origem, aparentemente observou-se um padrão, no qual 56% dos isolados provenientes de formigas (jardins de fungo e exoesqueleto) apresentaram ação antimicrobiana frente, a pelo menos, uma das três leveduras de referência (Figura 7). Por outro lado, 48% dos isolados endofíticos inibiram, pelo menos, uma bactéria de referência (Figura 7).

Figura 7. Porcentagem de cultivos brutos de isolados de fungos filamentosos que apresentaram ação antimicrobiana frente aos micro-organismos de referência, segundo o substrato de origem. As porcentagens foram calculadas em relação ao total de 85 isolados de formigas (jardim e exoesqueleto), 65 isolados endofíticos e 39 isolados epifíticos.



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 *Triagem e identificação dos fungos do acervo de pesquisa da CRM-UNESP*

As coleções de cultura geralmente preservam em seus acervos um número elevado de micro-organismos obtidos em diversos estudos. Este é o caso da CRM-UNESP, a qual possui um acervo diversificado de fungos derivados do solo, sedimentos e invertebrados de ambientes da Antártica, bem como fungos associados à plantas e a insetos sociais. O conhecimento taxonômico e a bioprospecção desse patrimônio genético são de extrema importância como alicerce para estudos futuros.

A CRM-UNESP encontra-se na fase de organização de seu acervo, com o intuito de estruturar uma coleção que possa atender às necessidades da comunidade científica, no que tange ao fornecimento de isolados de fungos com qualidade assegurada (puros, autênticos e viáveis; SETTE; PAGNOCCA; RODRIGUES, 2013). O presente estudo teve como foco, fungos provenientes de amostras de formigas, solo, folhas e compostagem. De um total de 215 isolados mantidos no acervo de pesquisa, apenas 14 (6,5%) perderam a viabilidade durante a criopreservação. Embora a criopreservação seja um método de rotina em coleções de cultura, é provável que este tenha afetado a viabilidade desses isolados, já que determinados grupos de fungos não resistem às condições de preservação a baixas temperaturas (RYAN et al., 2000). Considerando que acervo de pesquisa da CRM-UNESP abriga isolados de fungos depositados há mais de dez anos, cuja manutenção e checagem de viabilidade não foram realizadas com periodicidade, o método de criopreservação foi efetivo para manter a viabilidade da maior parte das culturas analisadas.

Tendo em vista a falta de periodicidade na manutenção dos isolados depositados no acervo de pesquisa, a ação da CRM-UNESP em recuperar esses isolados é essencial e de caráter urgente, pois o acervo de pesquisa compreende fungos não identificados, provenientes de diversos substratos (alguns deles de ambientes extremos, como o solo da Antártica) e com potencial biotecnológico desconhecido. Portanto, os fungos presentes nesse acervo constituem um patrimônio genético de importante valor científico e aplicado, o qual necessita de curadoria antes que muitos isolados sejam perdidos. Nesse contexto, o presente estudo, em conjunto com outros em andamento na instituição, são iniciativas para recuperar e estudar alguns dos fungos presentes no acervo de pesquisa da CRM-UNESP, visando conhecer a identidade e potencial biotecnológico para serem depositados no acervo principal.

Em relação ao uso do MSP-PCR, a técnica permitiu a redução do número de fungos submetidos à identificação, pois de 201 isolados, 150 foram sequenciados. Entretanto, no primeiro momento, a redução no número de isolados sequenciados não parece substancial. Tal resultado pode estar relacionado ao *primer* utilizado para verificar os polimorfismos (MEYER et al., 1993). No geral, o *primer* (GAC)<sub>5</sub> apresentou padrões de bandas diferenciados (polimórficos) para isolados pertencentes à mesma espécie, obrigando o sequenciamento de vários isolados dentro desses grupos para confirmar a identificação. Adicionalmente, o caráter diverso dos isolados analisados também pode ser responsável pela baixa triagem dos isolados. Levando em consideração que foram identificados 66 gêneros e 166 espécies, é de esperar que poucos são os isolados pertencentes aos mesmos grupos taxonômicos. Mesmo com os resultados obtidos no presente estudo, a técnica de MSP-PCR pode ser útil em trabalhos que lidam com isolamento de fungos em amostras ambientais, na tentativa de desreplicar os isolados redundantes obtidos nos métodos de cultivo. Portanto a técnica foi estabelecida na rotina de trabalho da coleção.

O método de MSP-PCR também sinalizou um fato bastante recorrente na identificação dos fungos do gênero *Fusarium*. Tal gênero é conhecido por possuir cópias parálogas da região ITS no genoma (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997). Nesse sentido, para muitos grupos de espécies desse gênero o marcador *barcode* não pode ser utilizado na distinção de espécies. Na figura 3 pode-se notar os perfis diferenciados de bandas para os grupos de MSP-PCR n. 10 e 16. O sequenciamento da região ITS desses grupos demonstrou que ambos pertencem ao complexo de espécies de *Fusarium oxysporum* (Apêndice A). É provável que os padrões de bandas n. 10 e 16 sejam espécies diferentes dentro deste complexo, pois a técnica de MSP-PCR considera o DNA genômico, o que possibilita observar variações infraespecíficas em um conjunto de isolados (MEYER et al., 1993). Entretanto, para confirmar essa hipótese é necessário o uso de outros marcadores moleculares que apresentem variabilidade intraespecífica suficiente, por exemplo, o gene que codifica para o fator alfa de alongação (O'DONNELL et al., 1998).

Após a triagem utilizando MSP-PCR, nossa abordagem taxonômica possibilitou identificar vários gêneros de fungos. No geral, o marcador molecular *barcode* possibilitou a delimitação de algumas espécies, porém para vários isolados as buscas nas bases de dados *online* resultaram em mais de um resultado diferente (Apêndice A). Nesses casos, para refinar a identificação até espécie, é necessário realizar análises filogenéticas para inserir a identificação dos fungos em um contexto evolutivo.

Os gêneros de fungos identificados no presente estudo foram reportados com potenciais causadores de doenças em plantas (*Albonectria*, *Fusarium*, *Guinardia*, *Neofusicoccum*, *Paraconiothyrium*, entre outros), como agentes oportunistas de doenças em animais (*Lichtheimia*), fungos termofílicos e termotolerantes (*Myceliophthora*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Thermomyces*), utilizados no controle biológico (*Beauveria* e *Trichoderma*), fungos reconhecidamente endofíticos (*Pestalotiopsis* e *Xylaria*), bem como fungos tipicamente encontrados no solo *Acremonium*, *Penicillium* e *Trichoderma*, (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1980). Esses fungos apresentam diversas origens, conforme relatado no Apêndice A. Portanto, os gêneros aqui encontrados representam parte da riqueza do acervo de pesquisa da CRM-UNESP, enfatizando a necessidade de curadoria desses fungos. Os isolados identificados estão em processo de depósito no acervo principal da CRM-UNESP, de modo a disponibilizar as informações associadas para a comunidade científica.

## 6.2 Potencial biotecnológico dos fungos do acervo de pesquisa da CRM-UNESP

No presente trabalho, foi possível observar a produção de compostos bioativos com propriedades antimicrobianas frente ao crescimento de patógenos de interesse clínico e agrícola. Cultivos brutos de isolados fúngicos depositados no acervo da CRM-UNESP apresentaram atividade antimicrobiana para todos os patógenos avaliados.

O teste de triagem utilizado demonstrou ser uma técnica eficiente pois detectou que 62,7% dos cultivos brutos inibiram o crescimento de, pelo menos, um dos micro-organismos de referência. No geral, as estratégias de triagem utilizadas nos estudos de prospecção de produtos naturais não apresentam um padrão em relação à quantidade de cultivos com atividade antimicrobiana. Por exemplo, a maioria dos estudos com cultivo de fungos relata uma porcentagem de 10 a 65% de extratos com atividade antimicrobiana, dentre o total de amostras analisadas (VAZ et al., 2009, ROSA et al., 2003; ROSA et al., 2012; VIEIRA et al., 2012; HENRÍQUEZ et al., 2014). Observando essas porcentagens e levando em consideração às diferenças entre os métodos utilizados entre os trabalhos, nota-se que os nossos resultados estão na faixa esperada de extratos com atividade antimicrobiana nas triagens (62,7%). Além disso, esses mesmos estudos de bioprospecção sugerem que os extratos com amplo espectro de ação são raros nas triagens; em contrapartida, extratos com espectro de ação reduzido, geralmente com ação inibitória frente a um ou dois micro-organismos de referência, são frequentemente encontrados em triagens em larga escala (VIEIRA et al., 2012; HENRÍQUEZ

et al., 2014). O mesmo padrão de resultado foi obtido no presente estudo, o que demonstra a validade da técnica de triagem utilizada.

O perfil de ação antimicrobiana dos cultivos brutos frente as leveduras de referência diferiram entre os isolados de origens distintas. Em particular, os fungos provenientes de formigas da tribo Attini (tanto de jardins de fungo, quanto de exoesqueleto) apresentaram uma maior porcentagem de isolados com ação em leveduras, quando comparadas com a ação frente às bactérias. As formigas da tribo Attini são conhecidas pela simbiose que mantêm com fungos basidiomicetos, cultivados por esses insetos como alimento (SCHULTZ; BRADY, 2008). É sabido que além desse fungo, os jardins desses insetos abrigam um microbioma diverso, incluindo leveduras, fungos filamentosos e bactérias (MUELLER et al., 2005; YOUNGSTEADT, 2008). Nesse microambiente ocorrem várias interações microbianas (antagonismos) mediadas por compostos químicos (SCHOENIAN et al., 2011). O mesmo pode ocorrer com os fungos endofíticos avaliados no presente estudo, os quais mantêm uma interação com seus hospedeiros (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004).

Nesse contexto, os fungos avaliados no presente projeto podem estar envolvidos nessas interações, o que explica o número de isolados produtores de compostos com atividade antifúngica provenientes desses ambientes. Por outro lado, nosso trabalho avaliou um número diferenciado de isolados de cada substrato, o que dificulta uma análise comparativa de correlação entre atividade antimicrobiana e substrato de origem. Estudos futuros que visem identificar tal correlação deverão sistematizar a seleção de isolados do acervo de modo a balancear o número de isolados por substrato.

No presente estudo consideramos como os melhores resultados de inibição, aqueles cultivos que formaram os maiores halos e aqueles que inibiram todos os micro-organismos de referência. Dentro desses critérios, os cultivos brutos dos fungos *P. aurantiogriseum* LESF 194, fungo não identificado LESF 227, *C. rosea* LESF 389, *P. dodgei* LESF 487 e *Xylaria* sp. 4 LESF 502 apresentaram os melhores resultados. Entretanto, o teste de difusão em ágar é um método de susceptibilidade que fornece, a princípio, resultados qualitativos (BAUER et al., 1966; JORGENSEN; FERRARO, 2009). Diversos fatores, como a composição do meio, estabilidade do composto antimicrobiano, densidade do inóculo de micro-organismo de referência, bem como o período de incubação, podem influenciar na difusão dos compostos antimicrobianos (RIOS et al., 1988). Portanto, cabe ressaltar que todos os cultivos que apresentaram inibição frente aos micro-organismos de referência (mesmo aqueles que

apresentaram pequenos halos) podem apresentar compostos antimicrobianos promissores para estudos futuros.

Espécies do gênero *Penicillium* são citadas como produtoras dos principais metabólitos secundários bioativos com potencial antimicrobiano na indústria farmacêutica e química, como as penicilinas produzidas por *P. rubens*, a griseofulvina produzida por *Penicillium griseofulvum* (SANDE; MANDELL, 1987; LACAZ; NEGRO, 1991; HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2011), as compactinas por *Penicillium solitum* e o ácido micofenólico produzido por *Penicillium glaucoma* (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008). Dos 6.450 metabólitos bioativos de fungos filamentosos catalogados até 2005, cerca de 15% são obtidos a partir desse gênero (BERDY, 2005). Portanto, é esperado encontrar isolados bioativos desse gênero no acervo da CRM-UNESP. No presente estudo, o cultivo bruto do isolado de *P. aurantiogriseum* LESF 194 proporcionou resultados com amplo espectro de ação frente a todos os micro-organismos de referência, bem como o isolado do mesmo gênero, *P. dodgei* LESF 487, que embora tenha demonstrado atividade frente a todos micro-organismos de referência, seus halos de inibição ficaram restritos a seis mm de diâmetro.

O fungo não identificado LESF 227 apresentou atividade contra todos os micro-organismos de referência, porém os halos de inibição não foram maiores que seis mm de diâmetro. Os resultados de identificação indicam que esse isolado pertence à classe Dothiomycetes (Ascomycota), possivelmente relacionado ao gênero *Pleurophomopsis*. Na literatura não existem trabalhos sobre os metabólitos produzidos por fungos desse gênero. Por exemplo, são encontrados informações sobre a sua patogenicidade como *Pleurophomopsis lignicola* causador de sinusite geralmente em pessoas imunodeficientes (PADHYE et al., 1997), além de ser encontrado em abscesso subcutâneo (CHABASSE et al., 1995; FARINA et al., 1997). Portanto, estudos sobre produtos naturais derivados do isolado LESF 227 devem ser realizados para avaliar se esse fungo é produtor de bioativos e seguro.

O cultivo bruto de *C. rosea* LESF 389 inibiu o crescimento das leveduras, entretanto, apresentou maior atividade frente às bactérias. Seu diferencial foi em relação à ação inibitória frente ao crescimento da levedura *C. albicans* e da bactéria *E. coli*, com um halo de inibição maior que os outros cultivos fúngicos que apresentaram amplo espectro de ação. *C. rosea*, anteriormente classificado como *Gliocladium roseum* e com teleomorfo denominado *Bionectria ochroleuca* (SCHROERS et al., 1999), é muito utilizado no controle biológico frente a *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Plicaria*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium* e *Helminthosporium*, todos fungos envolvidos em doenças de plantas. Além disso

*C. rosea* é utilizado no controle de doenças foliares, causadas por *Botrytis* e *Didymella*, no cultivo de legumes, ervas e plantas ornamentais, sendo comercializado como Prestop WP (nome comercial) e no controle do mofo cinzento na produção de mudas de morango e framboesa, utilizando-se o Prestop Mix (SUTTON et al., 1997; PUNJA; UTKHEDE, 2003; CHATTERTON; JAYARAMAN; PUNJA, 2008). O mecanismo de ação do biocontrole de *C. rosea* ainda não é conhecido, entretanto, alguns autores sugerem que tal fungo é capaz de produzir metabólitos com atividade antibiótica, enzimas hidrolíticas e promover a indução da defesa do hospedeiro (PUNJA; UTKHEDE, 2003). Metabólitos secundários da classe dos policetídeos já foram isolados de *C. rosea*, como os antibióticos TMC – 151 A – F (KOHNO et al., 1999). Por exemplo, a anrotainina, uma substância que pertence à classe das tetraciclina, é um importante antimicrobiano de amplo espectro (WONG, 1993) e as verticinas D, E e F apresentam atividade antibacteriana (JOSHI; GLOER; WICKLOW, 1999). Estes compostos cuja atividade antibacteriana é conhecida, provavelmente, podem ser produzidas pelo isolado *C. rosea* LESF 389, o que corrobora a maior atividade frente as bactérias na triagem antimicrobiana realizada.

O gênero *Xylaria* possui uma diversidade de metabólitos secundários já conhecida, tais como: sesquiterpenóides eremofilanos com atividade antiviral (SINGH et al., 1999), as azafilonas com muitas atividades biológicas, como antimicrobiana, antioxidante anti-inflamatória (OSMANOVA et al., 2010) e as *multiplolides* A e B com atividade antifúngica (BOONPHONG et al., 2001) entre outros. Todos estes metabólitos evidenciam o potencial deste fungo na produção de substâncias bioativas. Provavelmente o fungo *Xylaria* sp. 4 LESF 502 pode apresentar algum metabólito semelhante, pois o cultivo bruto deste fungo também apresentou inibição de amplo espectro sobre os micro-organismos de referência. *Xylaria* sp. geralmente é um membro da comunidade endofítica de plantas, sendo que muitos são produtores de metabólitos com atividade antifúngica.

O isolado *T. virens* LESF 514 apresentou o maior halo de inibição frente a *S. aureus*. Fungos pertencentes a esse gênero são reconhecidamente capazes de inibir o crescimento de micro-organismos fitopatogênicos, através da produção de metabólitos antifúngicos e enzimas hidrolíticas (VIZCAÍNO et al., 2005; SONG et al., 2006). Também são responsáveis pela produção de diferentes antibióticos como gliovirina, gliotoxina, viridina e pironas (VEY et al., 2001). Song et al. (2006), estudando metabólitos secundários de *Trichoderma koningii* SMF2, observaram uma ação inibitória maior no crescimento de *S. aureus*, em relação aos outros micro-organismos de referência. Segundo os autores, essa atividade está relacionada aos

compostos *Trichokonins*, que são grandes inibidores de bactérias Gram positivas (BRUCKNER; GRAF, 1983; GOULARD et al., 1995). Nesse contexto, a atividade antimicrobiana de *T. virens* LESF 514 pode estar relacionada a alguns desses compostos produzidos por isolados do gênero *Trichoderma*.

Conforme os resultados deste estudo, pode-se observar que dentre todos os microorganismos de referência, a bactéria *E. coli* foi a mais resistente, corroborando com os resultados de outros autores (SONG et al., 2006; VIEIRA et al., 2012; HENRÍQUEZ et al., 2014). A resistência da bactéria *E. coli* pode estar relacionada com a produção de uma variedade de enzimas como as penicilinases (HENQUELL et al., 1995) e as  $\beta$ -lactamases da classe C que atuam inibindo a ação dos antimicrobianos (LINDBERG; NORMARK, 1986; HONORE et al., 1989). Estas bactérias sofrem mutações nos genes de resistência que aumentam o espectro de atividade das  $\beta$ -lactamases (DAOUD; HAKIME, 2003). Estas enzimas são capazes de hidrolisar as cefalosporinas (JACOBY, 1997). Estudos observaram que esta bactéria pode aumentar a sua resistência na atividade das  $\beta$ -lactamases em até 57% em 2 anos em hospitais (MONNET et al., 1997).

No presente estudo foram obtidos cultivos promissores que podem ser avaliados quanto às classes de compostos químicos envolvidas na atividade antimicrobiana. Assim, este estudo ressalta a importância de explorar o potencial dos fungos filamentosos isolados de diversos ambientes e preservados na CRM-UNESP, agregando informações sobre metabólitos secundários bioativos produzidos pelos fungos mantidos no acervo. Além disso, nossos resultados são relevantes para P&D, visto que o acervo estudado pode apresentar propriedades específicas para aplicações na produção de biofármacos ou medicamentos, abrindo a perspectiva para o desenvolvimento de novos estudos, em busca de novas classes de antibióticos

## 7 CONCLUSÕES

- O presente estudo auxiliou na curadoria das culturas mantidas no acervo de pesquisa da CRM-UNESP, pois parte dos isolados desse acervo foram autenticados quanto à viabilidade e identificação taxonômica, os quais encontram-se em processo de depósito no acervo principal da coleção.
- O método de MSP-PCR auxiliou no agrupamento dos fungos e foi implantado com sucesso na rotina de identificação de fungos filamentosos da CRM-UNESP.
- O método para avaliar a produção de metabólitos secundários permitiu a análise simultânea de vários isolados de fungos filamentosos, sendo aplicada com sucesso na triagem de fungos produtores de metabólitos com atividade antimicrobiana.
- O presente estudo levantou evidências do potencial biotecnológico do acervo da CRM-UNESP, pois foram encontrados isolados de fungos produtores de metabólitos com amplo espectro frente a micro-organismos de interesse clínico e agrícola.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 23-25, 2004.
- BAUER, A. W.; KIRBY, M. D. K.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standard singles disc diffusion method. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 45, n. 2, p. 493 - 496, 1966.
- BELASQUE JUNIOR, J.; FERNANDES, N. G.; MASSARI, C. A. The success of eradication campaign os citrus canker in São Paulo states, Brazil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 2, p. 91-92, 2009.
- BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, London, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.
- BHAVANANI, S. M.; BALLOW, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 528-534, 2000.
- BOONPHONG, S.; KITTAKOOP, P.; ISAKA, M.; PITTAYAKHAJONWUT, D.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Multiplolides A and B, new antifungal 10 membered lactones from *Xylaria multiplex*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 64, n. 7, p. 965-967, 2001.
- BRASIL. **Ministério da Ciência e Tecnologia**. Sistema de Avaliação da Conformidade de Material Biológico. Brasília, SENAI/DN. p. 102, 2002.
- BRUCKNER, H.; GRAF, H. Paracelsin, a peptide antibiotic containing  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, isolated from *Trichoderma ressei* Simmons Part A. **Experientia**, Basel v. 39, n. 5, p. 528-530, 1983.
- BULL, A.T.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.
- CANTEROS, B. I. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In: **Plant pathogenic bacteria**. Proceedings of the International Society of Bacteriology, Centre for Advanced Study in Botany. Madras, Índia, University of Madras, p. 455-459. 1999.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, Mycological Society of America, Lawrence v. 91, n. 3, p. 553-556.1999.
- CARMO, E. S.; BELÉM, L. F.; CATÃO, R. M. R.; LIMA, E. O.; SILVEIRA, I. L.; SOARES, L. H. M. Microbiota fúngica presente em diversos setores de um hospital público em Campina Grande-PB. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 213- 216, 2007.

CASTOE, T.A.; STEPHENS, T.; NOONAN, B.P.; CALESTANI, C.; A novel group of type I polyketide synthases (PKS) in animals and the complex phylogenomics of PKSs. **Gene**, Amsterdam, v. 392, n. 1-2, p. 47-58, 2007.

CAVALCANTI, S. M. M.; FRANÇA, E. R.; CABRAL, C.; VILELA, M. A.; MONTENEGRO, F.; MENEZES, D.; MEDEIROS, A. C. R. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a University Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 9, n. 1, p. 56–63, 2005.

CHABASSE, D.; BIÈVRE, C.; LEGRAND, E.; SAINT-ANDRÉ, J. P.; GENTILE, L.; CIMON, B.; BOUCHARA, J. P.; Subcutaneous abscess caused by *Pleurophomopsis lignicola* Petr: first case. **Medical Mycology**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 415-417, 1995.

CHATTERTON, S.; JAYARAMAN, J.; PUNJA, Z. K. Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*. **Biological Control**, Orlando, v. 46, n. 2, p. 267-278, 2008.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards** 6. ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards**, CLSI document M27- A3, Wayne, PA., 2008.

DAOUD, Z.; HAKIME, N. Prevalence and susceptibility patterns of extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut. **Revista Española de Quimioterapia**, Lebanon, v. 16, n. 2, p. 233-8, 2003.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic press, 1980.

EVANS, B.; ROBINSON, S.; KELLEHER, N. Surveys of non-ribosomal peptide and polyketide assembly lines in fungi and prospects for their analysis in vitro and in vivo. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 48, n. 1, p. 49-61, 2011.

FARINA, C.; PUNITHALIGHAM, E.; RUGGENENTI, P.; GOGLIO, A. Phaeohyphomycotic soft tissue disease caused by *Pleurophomopsis lignicola* in a kidney transplant patient. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 46, n. 8, p. 699-703, 1997.

FREARSON, J. A.; COLLIE, I. T. HTS and hit finding in academia—from chemical genomics to drug discovery. **Drug discovery today**, Kidlington, v. 14, n. 23, p. 1150-1158, 2009.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, n. 2, p. 231-240, 2008.

GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E; CASAS, J.A.; GÓMEZ E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 7, p. 549-579, 2000.

- GERARDO, N. M.; MUELLER, G. M.; PRICE, S. L.; CURRIE, C. R. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B**, London, v. 271, n. 1550, p. 1791–1798, 2004.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, 1323–1330. 1995.
- GOLEBIEWSKI, A.; KLOPFENSTEIN, S. R.; PORTLOCK, D. E. Lead compounds discovered from libraries. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 5, n. 3, p. 273-284, 2001.
- GOULARD, C.; HLIMI, S.; REBUFFAT, S.; BODO, B.; Trichorzins HA and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*. I. Fermentation, isolation and biological properties. **The Journal of Antibiotics**, London, v. 48, n. 11, p. 1248-1253, 1995.
- GRIBBON, P.; ANDREAS, S. High-throughput drug discovery: what can we expect from HTS?. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 10, n. 1, p. 17-22, 2005.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, [s.n.], p. 95-98, 1999.
- HAZUDA, D. J.; FELOCK, P.; WITMER, M.; WOLFE, A.; STILLMOCK, K.; GROBLER, J. A.; ESPESETH, A.; GABRYELSKI, L.; SCHLEIF, W.; BLAU, C.; MILLER, M. D. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. **Science**, Washington, v. 287, n. 5453, p. 646-650, 2000.
- HENQUELL, C.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; SIROT, J. Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor-resistant TEM beta-lactamases from clinical isolates of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 39, n. 2, p. 427-430, 1995.
- HENRÍQUEZ, M.; VERGARA, K.; NORAMBUENA, J.; BEIZA, A.; MAZA, F.; UBILLA, P.; VACA, I. Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 65-76, 2014.
- HONORE, N.; NICOLAS, M. H.; COLE, S. T. Regulation of enterobacterial cephalosporinase production: the role of a membrane-bound sensory transducer. **Molecular Microbiology**, Malden, v. 3, n. 8, p. 1121-1130, 1989.
- HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. **IMA Fungus: The Global Mycological Journal**, Berkeley, v. 2, n. 1, p. 87–95, 2011.
- JACOBY, G. A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino- $\beta$ -lactams. **Infectious Disease clinics of North America**, Maryland Heights, v. 11, n. 4, p. 875-887, 1997.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 49, n. 11, p. 1749-1755, 2009

JOSHI, B.K.; GLOER, J.B.; WICKLOW, D.T. New Verticillin and Glisoprenin Analogues from *Gliocladium catenulatum*, a mycoparasite of *Aspergillus flavus* sclerotia. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 62, n. 5, p. 730-733, 1999.

KOHNO, J.; ASAI, Y.; NISHIO, M.; SAKURAI, M.; KAWANO, K.; HIRAMATSU, H.; KAMEDA, N.; KISHI, N.; OKUDA, T.; KOMATSUBARA, S. J. TMC-171A, B, C and TMC-154, novel polyketide antibiotics produced by *Gliocladium* sp. TC 1304 and TC 1282. **The Journal of Antibiotics**, London, v. 52, n. 12, p. 1114-1123, 1999.

KOROLKOVAS, A.; BURKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1988.

LACAZ, C. S.; NEGRO, G. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica Fungos, Actinomicetos e Algas de interesse médico**. São Paulo: Savier, 1991.

LINDBERG, F.; NORMARK, S. Contribution of chromosomal  $\beta$ -lactamases to  $\beta$ -lactam resistance in enterobacteria. **Review of Infectious Diseases**, Cary, v. 8, n. 3, p. 292-304, 1986.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery—then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**, 12. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2010.

MANNERS, J. G. **Principles of Plant Pathology**. 2.ed. Cambridge: University Press, 1993.

MEYER, D. F.; BOGDANOVA, A. J. Genomics-driven advances in *Xanthomonas* biology. In: JACKSON, R.W. **Plant Pathogenic Bacteria – Genomics and Molecular Biology**. Caiste Academic Press. Norfolk, Reino Unido, p. 147-161, 2009.

MEYER, W.; MITCHELL, T. G.; FREEDMAN, E. Z.; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the Polymerase Chain Reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington , v. 31, n.9, p. 2274-2280, 1993.

MOELLER, E. M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi. fruit bodies. and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford , v. 20, n. 22, p. 6115-6116, 1992.

MONNET, D. L. ; BIDDLE, J. W.; EDWARDS, J. R.; CULVER, D. H.; TOLSON, J. S.; MARTONE, W. J.; TENOVERA, F. C.; GAYNES, R. P. Evidence of interhospital transmission of extended-spectrum  $\beta$ -lactam resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United

States, 1986 to 1993. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, New York, v. 18, n. 7, p. 492-498, 1997.

MORGULIS, A.; COULOURIS, G.; RAYTSELIS, Y.; MADDEN, T. L.; AGARWALA, R.; SCHÄFFER A. A. "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", **Bioinformatics**, v. 24, n. 16, p. 1757-1764, 2008.

MUELLER, U. G.; GERARDO, N. M.; AANEN, D. K.; SIX, D. L.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in insects. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 36, n. x, p. 563-595, 2005.

MYSOREKAR, I. U.; HULTGREN, S. J. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.103, n.38, p. 14170–14175, 2006.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. B. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. 2010. Disponível em: <[www.citrusbr.com/download/biblioteca/Apresentacao\\_Marcos\\_Fava\\_evento\\_valor.pdf](http://www.citrusbr.com/download/biblioteca/Apresentacao_Marcos_Fava_evento_valor.pdf)>. Acesso em: 5 jul. 2014

OCDE. **Best Practice Guidelines for Biological Resource Centers**, Paris, France, 2007.

OCDE. Biological Resource Centers: Underpinning the Future of Life Sciences and Biotechnology. **OECD Publications**, Paris, p. 66, 2001.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 7, n. 1, p. 103-116, 1997.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of the Sciences United States of America**, Washington, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.

OLIVEIRA, L. G.; PUPO, M. T.; VIEIRA, P. C. Explorando produtos naturais microbianos nas fronteiras da Química e da Biologia. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 36, n. 10, p. 1577-1586, 2013.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L.D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. **MultiCiência**, São Carlos, n. 7, 2006.

OSMANOVA, N.; SCHULTZE, W.; AYOUB, N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 9, n. 2, p. 315-342, 2010.

PADHYE, A. A.; GUTEKUNST, R. W.; SMITH, D. J.; PUNITHALINGAM, E. Maxillary sinusitis caused by *Pleurophomopsis lignicola*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 8, p. 2136-2141, 1997.

PARKINSON, N.; ARITUA, V.; HEENEY, J.; COWIE, C.; BEW, J.; STEAD, D. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 57, p. 2881-2887, 2007.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Londres, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003.

QIAN, W.; JIA Y.; REN S. X.; HE, Y. Q.; FENG, J. X.; LU, L. F.; SUN, Q.; YING, G.; TANG, D. J.; TANG, H.; WU, W.; HAO, P.; WANG, L.; JIANG, B. L.; ZENG, S.; GU, W. Y.; LU, G.; RONG, L.; TIAN, Y.; YAO, Z.; FU, G.; CHEN, B.; FANG, R.; QIANG, B.; CHEN, Z.; ZHAO, G. P.; TANG, J. L.; HE, C. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 15, n. 6, p. 757-767, 2005.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 23, n. 2, p. 127-149, 1988.

RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G.; BACCI, M. JR.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungi garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 331-342, 2009.

ROHDE, C. SMITH, D.; MARTIN, D.; FRITZE, D.; STALPERS, J. Code of Conduct on Biosecurity for Biological Resource Centres: procedural implementation. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 63, n. 7, p. 2374-2382, 2013.

ROSA, L. H.; MACHADO, K. M. G.; JACOB, C. C.; CAPELARI, M.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 967-974, 2003.

ROSA, L. H.; TABANCA, N.; TECHEN, N.; WEDGE, D. E.; PAN, Z.; BERNIER, U. R.; MORAES, R. M. Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with micropropagated medicinal plant *Echinacea purpurea* (L.) Moench. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 3, p. 1105, 2012.

RYAN, M. J.; SMITH, D.; JEFFRIES, P. A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford v. 16, n. 2, p. 183-186, 2000.

SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; GAMS, W.; CASTLEBURY, L. A.; PETRINI, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, Lawrence, v. 94, n. 1, p. 146-170, 2002.

- SANDE, M. A.; MANDELL, G. L. Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e antivirais. In: GOODMAN, L.; GILMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987.
- SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W.; FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.
- SCHOENIAN, I.; SPITELLER, M.; GHASTE, M.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 108, n. 5, p. 1955-1960, 2011.
- SCHROERS, H. J.; SAMUELS, G. J.; SEIFERT, K. A.; GAMS, W. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. **Mycologia**, Lawrence, v. 91, n. 2, p. 365-385, 1999
- SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transition in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.
- SETTE, L. D.; PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A. Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation. **Fungal Genetics and Biology**, Maryland Heights, v. 60, p. 2-8, 2013.
- SINGH, S. B.; ZINK, D.; POLISHOOK, J.; VALENTINO, D.; SHAFIEE, A.; SILVERMAN, K.; FELOCK, P.; TERAN, A.; VILLELA, D.; HAZUDA, D. J.; LINGHAM, R. B. Structure and absolute stereochemistry of HIV-1 integrases inhibitor integric acid. A novel eremophilane sesquiterpenoid produced by a *Xylaria* sp. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 40, n. 50, p. 8775-8779, 1999.
- SMITH, D. Culture Collections. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 79, n. 2, p. 73-118, 2012.
- SONG, X. Y.; SHEN, Q. T.; XIE, S. T.; CHEN, X. L.; SUN, C. Y.; ZHANG, Y. Z. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, West Sussex, v. 260, n. 1, p. 119-125, 2006.
- SUTTON, J. C.; LI, D. W.; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.; VALDEBENITO - SANHUENZA, R. M. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 4, p. 316-328, 1997.
- TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.7, p.1807- 1813, 2008.

THORNE, N.; AULD, D. S.; INGLESE, J. Apparent activity in high-throughput screening: origins of compound-dependent assay interference. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 14, n. 3, p. 315-324, 2010.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, Biological tests and assays. Antibiotic-microbial assays. In: **United States Pharmacopeia XIX**, Rockville Mack Publishing Co., MO p. 595, 1975.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO” CÂMPUS DE RIO CLARO, Portaria IB nº 4, publicada em 8 de fevereiro de 2013. Dispõe sobre a criação da Central de Recursos Microbianas do Instituto de Biociências da Unesp - Campus de Rio Claro. (CRM/IB – UNESP). **Congregação**, 280ª Reunião Ordinária, Rio Claro, 2013.

VAZ, A. B. M.; BRANDÃO, L. R.; VIEIRA, M. L. A.; PIMENTA, R. S.; MORAIS, P. B.; SOBRAL, M. E. G.; ROSA, L. H.; ROSA, C. A. Diversity and antimicrobial activity of fungal endophyte communities associated with plants of Brazilian savanna ecosystems. **African Journal of Microbiology Research**, Victoria Island, v. 6, n. 13, p. 3173-3185, 2009.

VEY, A.; HOAGLAND, R. E.; BUTT, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: BUTT T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. **Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problem and Potential**, p. 311 - 46, 2001.

VIEIRA, M. L. A.; HUGHES, A. F. S.; GIL, V. B.; VAZ, A. B. M.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 58 n. 1, p. 54-66, 2012.

VIZCAÍNO, J. A.; SANZ, L.; BASILIO, A.; VICENTE, F.; GUTIÉRREZ, S.; HERMOSA, M. R.; MONTE, E. Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. **Mycological research**, London, v. 109, n. 12, p. 1397-1406, 2005.

WDCM. **Word Data Centre for Microorganisms**, 2015. Disponível em: <[www.wfcc.info/ccinfo/statistics/](http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics/)>. Acesso em: 20 maio. 2015.

WFCC. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms, **World Federation for Culture Collections**, 1999. Disponível em: <<http://wfcc.info/guideline.html>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, New York, v. 18, n.2 p. 315-322, 1990

WONG, S.; KULLNIG, R.; DEDINAS, J.; APPELL, K.; KYDD, G.; GILLUM, A.; COOPER, R.; MOORE, R. Anthrotaimin, an inhibitor of substance P binding produced by *Gliocladium catenulatum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 46, n. 2, p. 214-221, 1993.

YADAV, G.; GOKHALE, R.; MOHANTY, B. Computational approach for prediction of domain organization and substrate specificity of modular polyketide synthases. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 328, n. 2, p. 335-363, 2003.

YOUNGSTEADT, E. All that makes fungus gardens grow. **Science**, Washington, v. 320, n. 5879, p. 1006-1007, 2008.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences, **Journal of Computational Biology**, New York, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.

**APÊNDICE A.** Identificação dos fungos filamentosos mantidos no acervo de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP.

Códigos (LESF)	Origem <sup>1</sup>	Identificação final	Identificação molecular							MSP-PCR <sup>4</sup>
			NCBI-GenBank				CBS			
			Pb <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>	n. acesso	Espécie	%	n. acesso	Espécie	
464	Epifítico	<i>Aaosphaeria</i> sp.	549	95	DQ682563	<i>Arthopyreniaceae</i> sp.	95,4	CBS 175.79	<i>Aaosphaeria arxii</i>	<b>31</b>
488 <sup>R</sup>	Jardim de fungo	<i>Absidia</i> sp.	472	84	NR_103626	<i>Absidia anomala</i>	88	CBS 128.68	<i>Absidia psychrophilia</i>	<b>N</b>
452	Epifítico	<i>Acremonium</i> sp.	560	89	AY261368	<i>Beauveria felina</i>	98,7	CBS 746.73	<i>Acremonium zeylanicum</i>	<b>28</b>
376	Endofítico	<i>Acrocalymma medicaginis</i>	493	99	KP170621	<i>Acrocalymma medicaginis</i>	99,3	KP170621	<i>Acrocalymma medicaginis</i>	<b>29</b>
503	Jardim de fungo	<i>Agaricus fiardii</i>	557	100	JF797196	<i>Agaricus</i> sp.	97,2	CBS 284.94	<i>Agaricus fiardii</i>	<b>1</b>
518	Jardim de fungo	<i>Agaricus fiardii</i>	557	100	JF797196	<i>Agaricus</i> sp.	97,2	CBS 284.94	<i>Agaricus fiardii</i>	<b>1</b>
367	Endofítico	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	514	98	HM054158	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	98,6	HM054158	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	<b>2</b>
369	Endofítico	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	514	99	HM054158	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	99,2	HM054158	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	<b>2</b>
395	Endofítico	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	514	99	HM054158	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	99,2	HM054158	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	<b>2</b>
403	Endofítico	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	514	99	HM054158	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	99,2	HM054158	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	<b>2</b>
468	Endofítico	<i>Alternaria alternata</i>	552	99	KF465761	<i>Alternaria alternata</i>	100	CBS 916.96	<i>Alternaria alternata</i>	<b>30</b>
375	Endofítico	<i>Aspergillus fumigatus</i>	534	100	NR_121481	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	ATCC 1022	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<b>3</b>
401	Endofítico	<i>Aspergillus fumigatus</i>	534	100	NR_121481	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	ATCC 1022	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<b>3</b>
192	Jardim de fungo	<i>Aspergillus</i> sp.	525	99	AY373890	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	99,6	AY213649	<i>Aspergillus ruber</i>	<b>32</b>
434	Epifítico	<i>Bartalinia pondoensis</i>	575	99	JX854540	<i>Bartalinia pondoensis</i>	99,6	CBS 125525	<i>Bartalinia pondoensis</i>	<b>33</b>
477	Exoesqueleto	<i>Beauveria bassiana</i>	463	100	KF500409	<i>Beauveria bassiana</i>	100	AY531997	<i>Beauveria bassiana</i>	<b>34</b>
604	Jardim de fungo	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	619	100	KC157706	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	99,6	KC157835	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	<b>35</b>
521	Jardim de fungo	<i>Ceriporiopsis</i> sp.	612	91	FJ545252	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	89,6	CBS 347.63	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	<b>36</b>
436	Epifítico	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	530	100	AY361965	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	ATCC 58227	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<b>4</b>
455	Epifítico	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	530	100	AY361965	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	ATCC 58227	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<b>4</b>
469	Jardim de fungo	<i>Cladosporium</i> sp.	533	100	NR_119729	<i>Cladosporium colombiae</i>	100	HM148096	<i>Cladosporium globisporum</i>	<b>37</b>
605	Jardim de fungo	<i>Clonostachys rogersoniana</i>	579	99	KC806293	<i>Clonostachys rogersoniana</i>	100	CBS 920.97	<i>Clonostachys rogersoniana</i>	<b>38</b>
368 <sup>R</sup>	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	558	99	KM519669	<i>Clonostachys rosea</i>	99,6	CBS 161.72	<i>Bionectria ochroleuca</i>	<b>5</b>

379	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	558	99	KM519669	<i>Clonostachys rosea</i>	99,6	CBS 161.72	<i>Bionectria ochroleuca</i>	5
382	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	558	99	KM519669	<i>Clonostachys rosea</i>	99,6	CBS 161.72	<i>Bionectria ochroleuca</i>	5
389	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	495	99	EU552110	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	99,7	CBS 113336	<i>Bionectria ochroleuca</i>	<b>5</b>
391	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	553	99	KM519669	<i>Clonostachys rosea</i>	99,6	CBS 161.72	<i>Bionectria ochroleuca</i>	<b>5</b>
396	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	553	99	KM519669	<i>Clonostachys rosea</i>	99,6	CBS 161.72	<i>Bionectria ochroleuca</i>	5
410	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	553	99	KM519669	<i>Clonostachys rosea</i>	99,6	CBS 161.72	<i>Bionectria ochroleuca</i>	5
411	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	553	99	KM519669	<i>Clonostachys rosea</i>	99,6	CBS 161.72	<i>Bionectria ochroleuca</i>	5
442	Epifítico	<i>Clonostachys rosea</i>	553	99	KM519669	<i>Clonostachys rosea</i>	99,6	CBS 161.72	<i>Bionectria ochroleuca</i>	5
370	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	551	99	AJ890438	<i>Clonostachys</i> sp.	99,4	CBS 376.55	<i>Clonostachys rosea</i>	<b>6</b>
385	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	508	99	EU552110	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	99,8	CBS 113336	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	<b>6</b>
386	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	557	99	EU552110	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	99,8	CBS 113336	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	6
407	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	557	99	EU552110	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	99,8	CBS 113336	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	6
412	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	557	99	EU552110	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	99,8	CBS 113336	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	6
414	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	557	99	EU552110	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	99,8	CBS 113336	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	6
419	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	557	99	EU552110	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	99,8	CBS 113336	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	6
373	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	557	99	EU552110	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	99	CBS 113336	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	7
374 <sup>R</sup>	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	495	99	EU552110	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	99,7	CBS 113336	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	7
417	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	495	99	EU552110	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	99,7	CBS 113336	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	7
422	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	495	99	EU552110	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	99,7	CBS 113336	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	7
621	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	495	99	EU552110	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	99,7	CBS 113336	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	7
425	Endofítico	<i>Clonostachys rosea</i>	495	99	EU552110	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	99,7	CBS 113336	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	7
381	Endofítico	<i>Colletotrichum</i> sp.	542	99	GU994389	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	CBS 125476	<i>Colletotrichum corda</i>	<b>8</b>
400	Endofítico	<i>Colletotrichum</i> sp.	542	99	GU994389	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	CBS 125476	<i>Colletotrichum corda</i>	8
607	Jardim de fungo	<i>Corynespora cassicola</i>	512	97	AY238606	<i>Corynespora cassicola</i>	100	FJ852719	<i>Corynespora cassicola</i>	<b>39</b>
482 <sup>R</sup>	Jardim de fungo	<i>Cunninghamella elegans</i>	456	98	KJ183114	<i>Cunninghamella echinulata</i>	97	CBS 157.28	<i>Cunninghamella echinulata</i>	<b>N</b>
608	Jardim de fungo	<i>Cunninghamella</i> sp. 1	612	90	JN205891	<i>Cunninghamella clavata</i>	84,2	CBS 362.95	<i>Cunninghamella clavata</i>	<b>40</b>
489	Jardim de fungo	<i>Cunninghamella</i> sp. 2	-	-	-	ND	-	-	ND	<b>N</b>
491	Jardim de fungo	<i>Cytospora eucalypticola</i>	589	99	DQ923539	<i>Valsa fabianae</i>	98,7	CBS122689	<i>Cytospora eucalypticola</i>	<b>41</b>
463	Epifítico	<i>Diaporthe endophytica</i>	530	97	KC343065	<i>Diaporthe endophytica</i>	96,8	NR_111847	<i>Diaporthe endophytica</i>	<b>42</b>

416	Endofítico	<i>Diaporthe</i> sp.	560	99	KC343202	<i>Diaporthe</i> sp.	99,6	CBS 119639	<i>Diaporthe</i> sp.	<b>43</b>
492	Jardim de fungo	<i>Epicoccum nigrum</i>	527	99	FJ424241	<i>Epicoccum nigrum</i>	99,5	CBS 396.84	<i>Epicoccum nigrum</i>	<b>44</b>
493	Jardim de fungo	<i>Epicoccum sorghi</i>	516	99	KC106717	<i>Epicoccum sorghi</i>	99,6	CBS 301.89	<i>Epicoccum sorghi</i>	<b>45</b>
481 <sup>F</sup>	Jardim de fungo	<i>Escovopsioides nivea</i>	394	99	JQ815078	<i>Escovopsioides nivea</i>	99	JQ815078	<i>Escovopsioides nivea</i>	<b>46</b>
54	Jardim de fungo	<i>Escovopsis</i> sp.	-	-	-	ND	-	-	ND	<b>47</b>
429	Epifítico	<i>Fomitella supina</i>	642	96	JX082370	<i>Corioloopsis</i> sp.	99,9	CBS 366.34	<i>Fomitella supina</i>	<b>9</b>
606	Jardim de fungo	<i>Fomitella supina</i>	642	96	JX082370	<i>Corioloopsis</i> sp.	99,9	CBS 366.34	<i>Fomitella supina</i>	9
437	Epifítico	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	497	99	KM588224	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	99,5	CBS 306.91	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	<b>10</b>
443	Epifítico	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	497	99	KM588224	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	99,5	CBS 306.91	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	10
479	Exoesqueleto	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	497	99	KM588224	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	99,5	CBS 306.91	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	10
522	Jardim de fungo	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	540	100	FJ196766	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	100	AF455422	<i>Gibberella fujikuroi</i>	16
114	Exoesqueleto	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	540	99	FJ196766	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	100	AF455422	<i>Gibberella fujikuroi</i>	<b>16</b>
116	Exoesqueleto	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	540	99	FJ196766	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	100	AF455422	<i>Gibberella fujikuroi</i>	16
214	Jardim de fungo	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	520	100	GU327639	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	100	KM005082	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex	<b>131</b>
371	Endofítico	<i>Fusarium polyphialidicum</i>	456	99	FJ884098	<i>Fusarium polyphialidicum</i>	98	CBS 120989	<i>Fusarium polyphialidicum</i>	<b>130</b>
380	Endofítico	<i>Fusarium proliferatum</i>	479	99	KM513579	<i>Fusarium proliferatum</i>	97	KM513579	<i>Fusarium proliferatum</i>	<b>132</b>
377	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	451	98	JX270182	<i>Fusarium solani</i> species complex	98	JX270182	<i>Fusarium solani</i> species complex	<b>12</b>
378	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	533	98	JX270182	<i>Fusarium solani</i> species complex	98	CBS 241.93	<i>Fusarium solani</i> species complex	<b>12</b>
399	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	533	98	JX270182	<i>Fusarium solani</i> species complex	98	CBS 241.93	<i>Fusarium solani</i> species complex	12
405	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	533	98	JX270182	<i>Fusarium solani</i> species complex	98	CBS 241.93	<i>Fusarium solani</i> species complex	12
383	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	549	99	AB258993	<i>Fusarium solani</i> species complex	100	JN190943	<i>Fusarium solani</i> species complex	13
387	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	549	99	AB258993	<i>Fusarium solani</i> species complex	100	JN190943	<i>Fusarium solani</i> species complex	13
392	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	470	100	JX270182	<i>Fusarium solani</i> species complex	98	CBS 241.93	<i>Fusarium solani</i> species complex	<b>13</b>
397	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	549	99	AB258993	<i>Fusarium solani</i> species complex	100	JN190943	<i>Fusarium solani</i> species complex	13
418	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	549	99	AB258993	<i>Fusarium solani</i> species complex	100	JN190943	<i>Fusarium solani</i> species complex	13
421	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	549	99	AB258993	<i>Fusarium solani</i> species complex	100	JN190943	<i>Fusarium solani</i> species complex	<b>13</b>
426	Epifítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	549	99	AB258993	<i>Fusarium solani</i> species complex	100	JN190943	<i>Fusarium solani</i> species complex	13
394	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	518	99	HQ026747	<i>Fusarium solani</i> species complex	100	JX270165	<i>Fusarium solani</i> species complex	<b>14</b>
420	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	518	99	HQ026747	<i>Fusarium solani</i> species complex	100	JX270165	<i>Fusarium solani</i> species complex	<b>14</b>

424	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	518	99	HQ026747	<i>Fusarium solani</i> species complex	100	JX270165	<i>Fusarium solani</i> species complex	14
168	Jardim de fungo	<i>Fusarium solani</i> species complex	518	99	HQ026747	<i>Fusarium solani</i> species complex	100	JX270165	<i>Fusarium solani</i> species complex	14
393	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	437	99	JX435198	<i>Fusarium solani</i> species complex	99	CBS24193	<i>Fusarium solani</i> species complex	15
449	Epifítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	437	99	JX435198	<i>Fusarium solani</i> species complex	99	CBS24193	<i>Fusarium solani</i> species complex	15
337	Epifítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	549	100	JQ723750	<i>Fusarium solani</i> species complex	100	NRRL 46707	<i>Fusarium solani</i> species complex	133
388	Endofítico	<i>Fusarium solani</i> species complex	522	99	KM229694	<i>Fusarium solani</i> species complex	99,6	JX270165	<i>Fusarium solani</i> species complex	134
409	Endofítico	<i>Fusarium</i> sp. 3	527	98	EF687915	<i>Fusarium</i> sp.	97	HQ008919	<i>Fusarium</i> sp.	18
423	Endofítico	<i>Fusarium</i> sp. 3	527	98	EF687915	<i>Fusarium</i> sp.	97	HQ008919	<i>Fusarium</i> sp.	18
406	Endofítico	<i>Fusarium</i> sp. 4	498	100	GQ505685	<i>Fusarium</i> sp.	100	NRRL 52775	<i>Fusarium</i> sp.	19
408	Endofítico	<i>Fusarium</i> sp. 4	498	100	GQ505685	<i>Fusarium</i> sp.	100	NRRL 52775	<i>Fusarium</i> sp.	19
415	Endofítico	<i>Fusarium</i> sp. 5	527	99	GQ505685	<i>Fusarium</i> sp.	98	NRRL 31167	<i>Fusarium</i> sp.	135
384	Endofítico	<i>Fusarium</i> sp. 1	528	99	AF158314	<i>Fusarium</i> sp.	98	JF773629	<i>Fusarium</i> sp.	11
413	Endofítico	<i>Fusarium</i> sp. 1	528	99	AF158314	<i>Fusarium</i> sp.	98	JF773629	<i>Fusarium</i> sp.	11
448	Epifítico	<i>Fusarium</i> sp. 1	528	99	AF158314	<i>Fusarium</i> sp.	98	JF773629	<i>Fusarium</i> sp.	11
372	Endofítico	<i>Fusarium</i> sp. 2	525	100	KF367548	<i>Fusarium</i> sp.	100	HQ630965	<i>Fusarium</i> sp.	17
398	Endofítico	<i>Fusarium</i> sp. 2	525	100	KF367548	<i>Fusarium</i> sp.	100	HQ630965	<i>Fusarium</i> sp.	17
610	Jardim de fungo	<i>Guignardia mangiferae</i>	621	96	FJ538327	<i>Guignardia mangiferae</i>	99,3	CBS 373.54	<i>Guignardia mangiferae</i>	20
609	Jardim de fungo	<i>Guignardia mangiferae</i>	621	99	FJ538327	<i>Guignardia mangiferae</i>	99,3	CBS 373.54	<i>Guignardia mangiferae</i>	20
494	Jardim de fungo	<i>Guignardia mangiferae</i>	621	99	FJ538327	<i>Guignardia mangiferae</i>	99,3	CBS 373.54	<i>Guignardia mangiferae</i>	20
133	Solo	<i>Hendersonia</i> sp.	516	96	KJ869114	<i>Phaeosphaeria poagena</i>	97,6	CBS 100.72	<i>Hendersonia culmiseda</i>	57
366	Compostagem	<i>Lichtheimia ramosa</i>	786	99	FJ719382	<i>Lichtheimia ramosa</i>	98,9	CBS 649.78	<i>Lichtheimia ramosa</i>	61
198 <sup>R</sup>	Jardim de fungo	<i>Lophiostoma</i> sp.	481	97	KM519673	<i>Lophiostoma corticola</i>	96	HM116744	<i>Lophiostoma</i> sp.	62
467	Jardim de fungo	<i>Lophiostoma</i> sp.	530	91	FJ372389	<i>Lophiostoma</i> sp.	88,3	CBS 123543	<i>Lophiostoma</i> sp.	63
611	Jardim de fungo	<i>Marasmius cladophyllus</i>	545	99	HQ248211	<i>Marasmius cladophyllus</i>	100	HQ248212	<i>Marasmius cladophyllus</i>	64
612	Jardim de fungo	<i>Mariannaea elegans</i>	503	99	AB111493	<i>Mariannaea elegans</i>	99,8	CBS 239.56	<i>Mariannaea elegans</i>	65
490 <sup>F</sup>	Jardim de fungo	<i>Mucor hiemalis</i>	484	88	JF299218	<i>Mucor hiemalis</i>	92	CBS 976.68	<i>Mucor hiemalis</i>	68
508	Jardim de fungo	<i>Mucor parvisseptatus</i>	632	95	JN206109	<i>Mucor parvisseptatus</i>	95,3	CBS 522.79	<i>Mucor parvisseptatus</i>	69
439	Epifítico	<i>Mucor</i> sp.	-	-	-	ND	-	-	ND	66
446	Epifítico	<i>Mucor</i> sp.	-	-	-	ND	-	-	ND	67

617	Compostagem	<i>Myceliophthora thermophila</i>	555	99	KC146362	<i>Myceliophthora thermophila</i>	100	CBS 669.85	<i>Myceliophthora thermophila</i>	<b>70</b>
495	Jardim de fungo	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>	559	100	EU860376	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>	98,9	CBS 115679	<i>Botryosphaeria eucalyptorum</i>	<b>71</b>
203	Jardim de fungo	<i>Ochroconis cordanae</i>	622	99	FJ372390	<i>Ochroconis cordanae</i>	99,3	CBS 780.83	<i>Ochroconis humicola</i>	<b>72</b>
496	Jardim de fungo	<i>Oidiodendron</i> sp.	441	99	AF307773	<i>Oidiodendron tenuissimum</i>	100	CBS 114896	<i>Oidiodendron setiferum</i>	<b>73</b>
504	Jardim de fungo	<i>Oudemansiella canarii</i>	626	98	HQ534101	<i>Oudemansiella canarii</i>	99,6	HQ534101	<i>Oudemansiella canarii</i>	<b>74</b>
486	Solo	<i>Paecilomyces victoriae</i>	558	99	JN899393	<i>Paecilomyces victoriae</i>	99,4	JN899393	<i>Paecilomyces victoriae</i>	<b>75</b>
453	Epifítico	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	549	95	DQ682563	<i>Arthopyreniaceae</i> sp.	95,2	CBS 465.69	<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	<b>76</b>
497	Jardim de fungo	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	566	99	HQ630993	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	99,8	CBS 591.73	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	<b>77</b>
440 <sup>β</sup>	Epifítico	<i>Penicillium citrinum</i>	446	100	GU944542	<i>Penicillium citrinum</i>	100	CBS 117.64	<i>Penicillium citrinum</i>	<b>78</b>
194 <sup>β</sup>	Jardim de fungo	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	425	99	AY674298	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	99,5	CBS 792.95	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	<b>79</b>
193 <sup>β</sup>	Jardim de fungo	<i>Penicillium canescens</i>	431	99	DQ658166	<i>Penicillium canescens</i>	99,7	CBS 458.69	<i>Penicillium canescens</i>	<b>80</b>
487 <sup>β</sup>	Solo	<i>Penicillium dodgei</i>	469	97	EU021669	<i>Eupenicillium brefeldianum</i>	97,2	CBS 235.81	<i>Eupenicillium brefeldianum</i>	<b>81</b>
441 <sup>β</sup>	Epifítico	<i>Penicillium rolfsii</i>	478	99	GU981667	<i>Penicillium rolfsii</i>	99,3	CBS 368.48	<i>Penicillium rolfsii</i>	<b>83</b>
484 <sup>β</sup>	Solo	<i>Penicillium simplicissimum</i>	477	99	KM088679	<i>Penicillium simplicissimum</i>	98,7	CBS 280.39	<i>Penicillium simplicissimum</i>	<b>84</b>
213 <sup>β</sup>	Solo	<i>Penicillium</i> sp. 1	-	-	-	ND	-	-	ND	<b>85</b>
447 <sup>β</sup>	Epifítico	<i>Penicillium</i> sp. 2	-	-	-	ND	-	-	ND	<b>86</b>
512 <sup>β</sup>	Jardim de fungo	<i>Penicillium</i> sp. 3	-	-	-	ND	-	-	ND	<b>87</b>
513 <sup>β</sup>	Jardim de fungo	<i>Penicillium</i> sp. 4	-	-	-	ND	-	-	ND	<b>88</b>
188 <sup>β</sup>	Jardim de fungo	<i>Penicillium</i> sp. 5	-	-	-	ND	-	-	ND	<b>82</b>
202 <sup>β</sup>	Jardim de fungo	<i>Penicillium spinulosum</i>	421	100	GQ367503	<i>Penicillium spinulosum</i>	100	CBS 289.36	<i>Penicillium spinulosum</i>	<b>89</b>
200 <sup>β</sup>	Jardim de fungo	<i>Penicillium waksmanii</i>	442	100	JN606787	<i>Penicillium pancosmium</i>	99,5	CBS 276.75	<i>Penicillium pancosmium</i>	<b>90</b>
505	Jardim de fungo	<i>Peniophora crassitunicata</i>	619	99	GU388305	<i>Peniophora</i> sp.	96,2	CBS 663.91	<i>Peniophora crassitunicata</i>	<b>91</b>
435	Epifítico	<i>Periconia byssoides</i>	563	99	KC954161	<i>Periconia byssoides</i>	99	KC954161	<i>Periconia byssoides</i>	22
461	Epifítico	<i>Periconia byssoides</i>	563	99	KC954161	<i>Periconia byssoides</i>	99	KC954161	<i>Periconia byssoides</i>	<b>22</b>
347	Epifítico	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	532	100	KM199347	<i>Neopestalotiopsis cubana</i>	100	EF423522	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<b>23</b>
444	Epifítico	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	-	-	-	ND	-	-	ND	<b>24</b>
445	Epifítico	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	532	100	KM199347	<i>Neopestalotiopsis cubana</i>	100	EF423522	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	23
451	Epifítico	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	506	100	KM199347	<i>Neopestalotiopsis cubana</i>	99	EF423522	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<b>23</b>
458	Epifítico	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	532	100	KM199347	<i>Neopestalotiopsis cubana</i>	100	EF423522	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	23

430	Endofítico	<i>Peyronellaea coffeae-arabicae</i>	521	99	FJ950743	<i>Phoma</i> sp.	100	CBS 123380	<i>Peyronellaea coffeae-arabicae</i>	92
498	Jardim de fungo	<i>Phaeosphaeria herpotrichoides</i>	569	98	AJ608969	<i>Leptosphaeria</i> sp.	98,4	CBS 387.86	<i>Phaeosphaeria herpotrichoides</i>	93
499	Jardim de fungo	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	483	95	JQ388917	<i>Pleosporales</i> sp.	96,3	CBS 120248	<i>Phaeosphaeria brevispora</i>	94
500	Jardim de fungo	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	529	99	JQ936272	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	99,8	MPB17A	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	95
432	Epifítico	<i>Phanerochaete sordida</i>	460	100	HQ248216	<i>Phanerochaete sordida</i>	100	HQ248216	<i>Phanerochaete sordida</i>	25
462 <sup>R</sup>	Epifítico	<i>Phanerochaete sordida</i>	460	100	HQ248216	<i>Phanerochaete sordida</i>	100	HQ248216	<i>Phanerochaete sordida</i>	25
613	Jardim de fungo	<i>Phlebia livida</i>	576	97	AB0846181	<i>Phlebia livida</i>	96,9	AB0846181	<i>Phlebia livida</i>	96
506	Jardim de fungo	<i>Phlebia subserialis</i>	638	98	HQ377286	<i>Phlebia subserialis</i>	97,9	UFMGCB 1883	<i>Phlebia subserialis</i>	97
485	Solo	<i>Phoma</i> sp.	516	99	GQ370376	<i>Phoma</i> sp.	100	CBS 301.89	<i>Leptosphaeria spegazzinii</i>	98
390	Endofítico	<i>Phomopsis</i> sp. 1	480	97	JN153051	<i>Phomopsis</i> sp.	97	JN153051	<i>Phomopsis</i> sp.	99
404 <sup>R</sup>	Endofítico	<i>Phomopsis</i> sp. 2	352	97	JN153053	<i>Phomopsis</i> sp.	95,4	CBS 133180	<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	100
472	Jardim de fungo	<i>Pithomyces chartarum</i>	595	100	HQ607815	<i>Pithomyces chartarum</i>	100	CBS 486.66	<i>Pithomyces terricola</i>	101
483	Solo	<i>Pithomyces</i> sp.	590	95	KP132538	<i>Pithomyces sacchari</i>	100	CBS 621.72	<i>Pithomyces atro-olivaceus</i>	102
614	Jardim de fungo	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	623	98	FR799458	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	98	0909CI1A1	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	103
476	Exoesqueleto	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	504	99	HQ842818	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	98,8	CBS 430.87	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	26
478	Exoesqueleto	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	504	99	HQ842818	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	98,8	CBS 430.87	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	26
433	Epifítico	<i>Rhizomucor variabilis</i>	621	98	HM623314	<i>Rhizomucor variabilis</i>	98,2	CBS 103.93	<i>Rhizomucor variabilis</i>	104
618	Compostagem	<i>Rhizopus microsporus</i>	676	100	AY803935	<i>Rhizopus microsporus</i>	100	CBS 338.62	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	105
191	Jardim de fungo	<i>Schizophyllum commune</i>	618	98	AF348142	<i>Schizophyllum commune</i>	99	CBS 579.83	<i>Schizophyllum commune</i>	106
616	Jardim de fungo	<i>Schizophyllum commune</i>	640	98	AF348142	<i>Schizophyllum commune</i>	99	CBS 579.83	<i>Schizophyllum commune</i>	107
480	Jardim de fungo	<i>Scopulariopsis</i> sp.	-	-	-	ND	-	-	ND	108
471	Jardim de fungo	<i>Scytalidium</i> sp.	555	90	GQ503339	<i>Scytalidium cuboideum</i>	98,5	CBS 384.84	<i>Verticillium tricorpus</i>	109
619	Compostagem	<i>Scytalidium thermophilum</i>	553	99	EF550968	<i>Humicola insolens</i>	100	CBS 629.91	<i>Scytalidium thermophilum</i>	110
501	Jardim de fungo	<i>Setophoma chromolaena</i>	571	98	KF251244.	<i>Setophoma chromolaena</i>	97,7	CBS 135105	<i>Setophoma chromolaena</i>	111
180	Jardim de fungo	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	-	-	-	ND	-	-	ND	N
204 <sup>B</sup>	Jardim de fungo	<i>Talaromyces funiculosus</i>	431	98	KM066162	<i>Talaromyces funiculosus</i>	99,3	CBS 433.89	<i>Talaromyces funiculosus</i>	112
511 <sup>B</sup>	Jardim de fungo	<i>Talaromyces muroii</i>	413	99	KJ865727	<i>Talaromyces muroii</i>	99,6	CBS 756.96	<i>Talaromyces muroii</i>	113
438 <sup>B</sup>	Epifítico	<i>Talaromyces</i> sp.	412	94	KJ865727	<i>Talaromyces muroii</i>	94,7	CBS 261.55	<i>Talaromyces flavus</i> var. <i>flavus</i>	114
620	Compostagem	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	609	99	JF412006	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	100	CBS 630.91	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	115

507	Jardim de fungo	<i>Trametes hirsuta</i>	609	99	JX861099	<i>Trametes hirsuta</i>	98,5	CBS 282.73	<i>Trametes hirsuta</i>	<b>N</b>
541 <sup>a</sup>	Jardim de fungo	<i>Trichoderma andinense</i>	583	93	KJ713205	<i>Trichoderma andinense</i>	98	CBS 886.72	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	<b>117</b>
560 <sup>a</sup>	Jardim de fungo	<i>Trichoderma andinense</i>	583	98	JQ425717	<i>Hypocrea andinensis</i>	80	CBS 348.93	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	<b>122</b>
236 <sup>a</sup>	Jardim de fungo	<i>Trichoderma</i> sp.	623	83	KJ665729	<i>Trichoderma sinuosum</i>	75,6	CBS 121556	<i>Hypocrea estonica</i>	<b>119</b>
459 <sup>a</sup>	Epifítico	<i>Trichoderma</i> cf. <i>strigosum</i>	586	99	AY937442	<i>Trichoderma</i> cf. <i>strigosum</i>	99,3	CBS 348.93	<i>Trichoderma</i> cf. <i>strigosum</i>	<b>27</b>
460 <sup>a</sup>	Epifítico	<i>Trichoderma</i> cf. <i>strigosum</i>	586	99	AY937442	<i>Trichoderma</i> cf. <i>strigosum</i>	99,4	CBS 348.93	<i>Trichoderma</i> cf. <i>strigosum</i>	<b>27</b>
431 <sup>a</sup>	Epifítico	<i>Trichoderma deliquescens</i>	599	98	JN943364	<i>Hypocrea lutea</i>	98,3	NBRC 104902	<i>Hypocrea lutea</i>	<b>136</b>
344 <sup>a</sup>	Epifítico	<i>Trichoderma harzianum</i>	590	96	AF348101	<i>Hypocrea lixii</i>	99,6	AF348093	<i>Hypocrea lixii</i>	<b>58</b>
517 <sup>a</sup>	Jardim de fungo	<i>Trichoderma harzianum</i>	580	96	HQ222311	<i>Hypocrea lixii</i>	96	CBS 115337	<i>Hypocrea lixii</i>	<b>59</b>
450 <sup>Re</sup>	Epifítico	<i>Trichoderma harzianum</i>	367	99	KP008900	<i>Trichoderma</i> aff. <i>harzianum</i>	99	FJ463338	<i>Hypocrea lixii</i>	<b>60</b>
212 <sup>a</sup>	Jardim de fungo	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	593	98	JQ617310	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	98,9	JQ040437	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	<b>118</b>
516 <sup>a</sup>	Jardim de fungo	<i>Trichoderma orientalis</i>	619	97	JN175576	<i>Hypocrea orientalis</i>	95	CBS 124618	<i>Trichoderma novaezelandiae</i>	<b>120</b>
456 <sup>a</sup>	Epifítico	<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-	ND	-	-	ND	<b>116</b>
515 <sup>a</sup>	Jardim de fungo	<i>Trichoderma spirale</i>	570	99	AY750890	<i>Trichoderma spirale</i>	98,5	CBS 346.93	<i>Trichoderma spirale</i>	<b>121</b>
514 <sup>a</sup>	Jardim de fungo	<i>Trichoderma virens</i>	590	97	AY750891	<i>Trichoderma virens</i>	97	EU280065	<i>Trichoderma virens</i>	<b>123</b>
509	Jardim de fungo	<i>Umbelopsis nana</i>	599	100	KC489506	<i>Umbelopsis nana</i>	100	CBS 696.68	<i>Absidia macrospora</i>	<b>124</b>
428	Endofítico	<i>Xylaria</i> sp. 1	559	99	GU373810	<i>Xylaria cubensis</i>	99,2	KF436373	Fungal endophyte culture-collection	<b>125</b>
457	Endofítico	<i>Xylaria</i> sp. 2	558	99	AB743839	<i>Xylaria</i> sp.	99	AB440101	<i>Xylariaceae</i> sp.	<b>126</b>
473	Jardim de fungo	<i>Xylaria</i> sp. 3	563	85	AB743839	<i>Xylaria</i> sp.	81	CBS 401.58	<i>Xylaria sicula</i>	<b>127</b>
474	Jardim de fungo	<i>Xylaria</i> sp. 3	562	85	AB524024	<i>Xylaria</i> sp.	81	CBS 401.58	<i>Xylaria sicula</i>	<b>128</b>
502	Jardim de fungo	<i>Xylaria</i> sp. 4	594	97	DQ139271	<i>Xylaria</i> sp.	84,1	CBS 126417	<i>Xylaria hypoxylon</i>	<b>129</b>
427	Jardim de fungo	FNI <sup>5</sup>	525	84	JF439480	Hypocreales	82	CBS 130361	<i>Acremonium variegolor</i>	<b>21</b>
454	Jardim de fungo	FNI <sup>5</sup>	525	84	JF439480	Hypocreales	82	CBS 130362	<i>Acremonium variegolor</i>	<b>21</b>
227	Jardim de fungo	FNI <sup>5</sup>	635	90	JQ760418	Dothideomycetes	99	HQ607933	Ascomycota	<b>48</b>
199	Endofítico	FNI <sup>5</sup>	552	95	JN545826	Pleosporales	95	JN545826	Pleosporales	<b>49</b>
205	Epifítico	FNI <sup>5</sup>	516	100	HQ607988	Dothideales	100	HQ607988	Dothideales	<b>50</b>
402	Epifítico	FNI <sup>5</sup>	-	-	-	ND	-	-	ND	<b>51</b>
465	Jardim de fungo	FNI <sup>5</sup>	-	-	-	ND	-	-	ND	<b>52</b>
466	Endofítico	FNI <sup>5</sup>	-	-	-	ND	-	-	ND	<b>53</b>

470	Jardim de fungo	FNI <sup>5</sup>	-	-	-	ND	-	-	ND	<b>54</b>
510	Jardim de fungo	FNI <sup>5</sup>	575	99	JQ815078	Hypocreales	99,4	EU082786	Ascomycota	<b>55</b>
615	Jardim de fungo	FNI <sup>5</sup>	592	99	EF672294	Polyporales	99,4	EF672294	Polyporales	<b>N</b>
475 <sup>R</sup>	Jardim de fungo	FNI <sup>5</sup>	696	87	GQ999148	<i>Uncultured fungus clone</i>	-	-	<i>No matching sequence</i>	<b>56</b>

<sup>1</sup>: Substrato de origem dos fungos: Jardim de fungo de formigas da tribo Attini, Exoesqueleto de formigas da tribo Attini, Compostagem de torta de filtro de cana-de-açúcar, Solo e Endofíticos/Epifíticos de plantas.

<sup>2</sup>: Pares de base

<sup>3</sup>: Porcentagem de similaridade da sequência alvo com as sequências depositadas nas bases de dados do NCBI-GenBank e CBS.

<sup>4</sup>: Agrupamentos obtidos no MSP-PCR. Números em negrito correspondem aos isolados sequenciados dentro de cada perfil de banda de MSP-PCR. N: isolados não amplificados pelo MSP-PCR.

<sup>5</sup>: Fungo não identificado

<sup>F</sup>: Somente a sequência *forward* foi gerada.

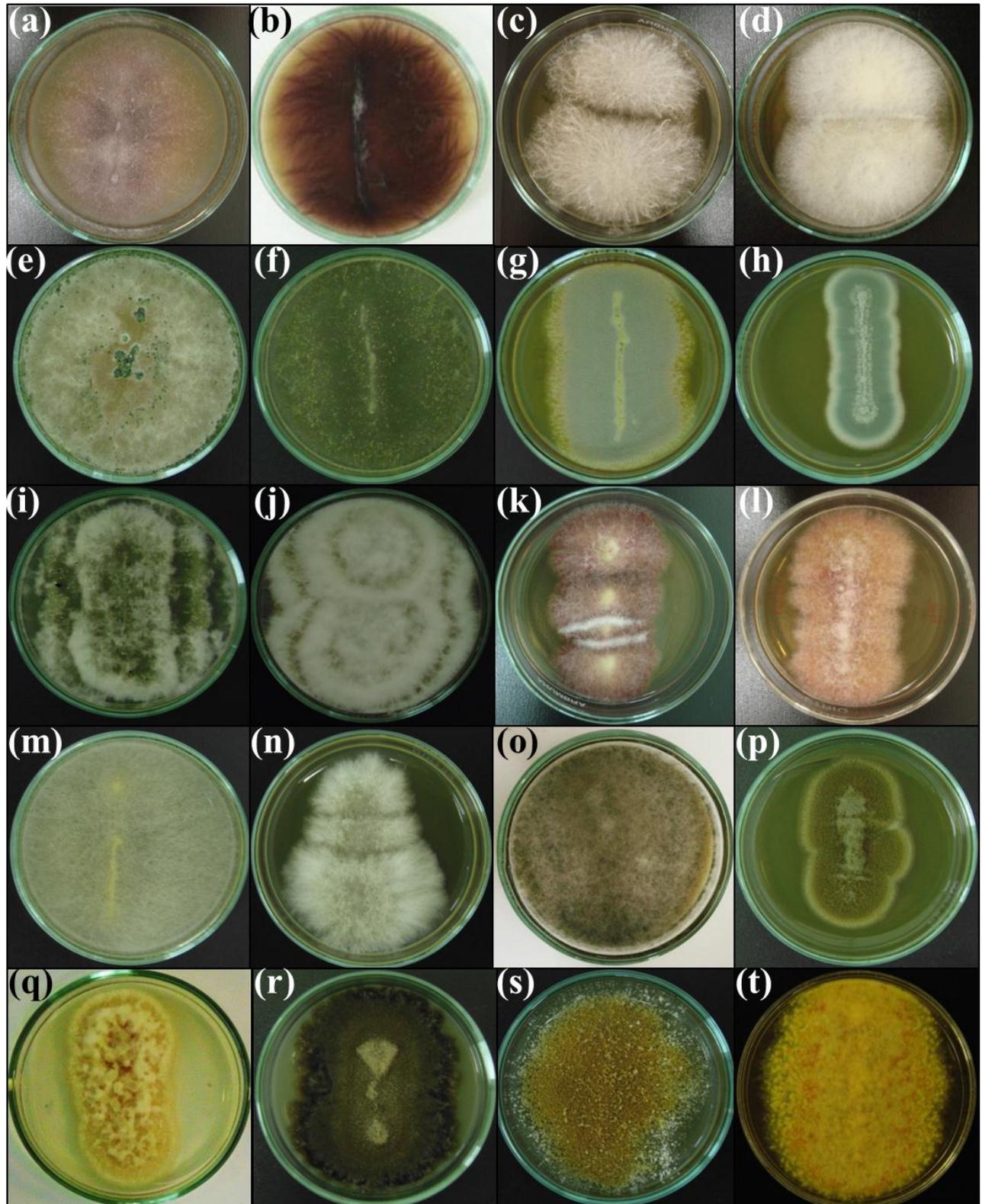
<sup>R</sup>: Somente a sequência *reverse* foi gerada.

<sup>α</sup>: Gene que codifica para a proteína do fator alfa de alongação (alguns isolados tiveram esse marcador sequenciado).

<sup>β</sup>: Gene que codifica para a proteína beta tubulina (alguns isolados tiveram esse marcador sequenciado).

ND: Não determinado

**APÊNDICE B.** Aspecto geral dos fungos filamentosos examinados no presente estudo e mantidos no acervo de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP.



(a) *Fusarium solani* species complex; (b) *Fusarium oxysporum* species complex; (c) *Clonostachys rosea*; (d) *Clonostachys rosea*; (e) *Trichoderma harzianum*; (f) *Trichoderma* cf. *strigosum*; (g) *Penicillium simplicissimum*; (h) *Penicillium citrinum*; (i) *Pestalotiopsis* sp.; (j) *Pestalotiopsis* sp. (k) *Albonectria rigidiuscula*; (l) *Albonectria rigidiuscula*; (m) *Mucor* sp.; (n) *Xylaria* sp. 3; (o) *Colletotrichum* sp.; (p) *Cladosporium* sp. (q) *Setophoma chromolaena*; (r) *Lophiostoma* sp. (s) *Escovopsis* sp.; (t) *Paecilomyces victoriae*