

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Flores e Saúde Pública: uma análise epidemiológica
por métodos microbiológicos e moleculares**

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da
Saúde

Débora Raquel Melo Martins

Orientadora

Professora Doutora Ana Cláudia Correia Coelho

Coorientadora

Professora Doutora Maria Manuela Outeiro Correia de Matos



Vila Real, 2019

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Flores e Saúde Pública: uma análise epidemiológica
por métodos microbiológicos e moleculares**

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da
Saúde

Débora Raquel Melo Martins

Orientadora

Professora Doutora Ana Cláudia Correia Coelho

Coorientadora

Professora Doutora Maria Manuela Outeiro Correia de Matos



Vila Real, 2019

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Flores e Saúde Pública: uma análise epidemiológica
por métodos microbiológicos e moleculares**

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da
Saúde

Débora Raquel Melo Martins

Orientadora

Professora Doutora Ana Cláudia Correia Coelho

Coorientadora

Professora Doutora Maria Manuela Outeiro Correia de Matos

Composição do Júri:

Vila Real, 2019

Agradecimentos

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) nomeadamente ao Magnífico Reitor, Professor Doutor António Fontainhas Fernandes, por todo o trabalho realizado para um maior reconhecimento da instituição e pela possibilidade de realizar trabalhos de investigação.

Ao corpo docente e à coordenação do Mestrado de Biotecnologia para as Ciências da Saúde, pelo apoio, disponibilidade e profissionalismo.

À Professora Doutora Ana Cláudia Coelho, que me orientou neste trabalho, pela oportunidade e ajuda, pela disponibilidade sempre presente ao longo deste trabalho e pelo incentivo e simpatia.

À Professora Doutora Manuela Matos, que foi a minha coorientadora, pela disponibilidade e ajuda e pelo incentivo e simpatia ao longo deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia Médica, incluindo, a D.^a Sónia Dias, D.^a Fátima Peixoto, D.^a Lurdes Campos e D.^a Fátima Fraga, por toda ajuda e disponibilidade prestados e pela simpatia.

À Ana Sofia Soares, pela disponibilidade e por toda a ajuda e ensinamentos no laboratório de Microbiologia Médica.

À Sandra Martins, pela disponibilidade, ajuda e simpatia, ensinamentos e auxílio no Laboratório de Genética Molecular Aplicada.

À Marlene Santos, pela disponibilidade, ajuda, compreensão, simpatia e amizade, e pelos ensinamentos e auxílio no Laboratório de Genética Molecular Aplicada.

Ao Rodolfo Ferreira e à Telma Ferreira, com quem trabalhei e partilhei os laboratórios, pela ajuda, disponibilidade, compreensão, companheirismo, simpatia e amizade.

Ao Ludgero, pela ajuda, apoio e conselhos.

À minha família, em especial aos meus pais e irmão, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, pelo amor e carinho sempre demonstrados.

Ao Leo, pela companhia e carinho nos momentos difíceis e que sempre me animou quando mais precisei.

Alguns dos resultados desta dissertação foram apresentados em Jornadas na forma de comunicação em painel (documentação em anexo).

Resumo

Os fungos filamentosos presentes nas flores podem ser um risco para a saúde pública, uma vez que são fungos oportunistas com potencial patogénico, em especial para indivíduos imunodeprimidos. As flores estão presentes em muitos ambientes e são comumente oferecidas, utilizadas para enfeitar ambientes e casas. O simples ato de cheirar uma flor pode levar à inalação de esporos fúngicos, podendo ocorrer risco de contaminação ou colonização das fossas nasais ou mesmo permitir que estes esporos atinjam as vias respiratórias inferiores. Assim, torna-se importante o rastreio de fungos filamentosos em flores.

Neste trabalho efetuou-se a colheita de 121 flores de jardim de várias espécies, em dois locais diferentes (Tarouca e Vila Real) e em duas épocas do ano (Outono e Inverno). Em todas as amostras foram sujeitas a cultura fúngica e a isolamento dos principais géneros de fungos filamentosos com importância médica e foi ainda efetuado um estudo molecular pela técnica de ISSR. Em todas as amostras foi possível isolar e identificar, pelo menos um género fúngico, no total 6 géneros fúngicos diferentes e 1 espécie (*Talaromyces marneffe*) foram identificados. *Cladosporium* foi o género mais ocorrente (99,2%), seguido de *Penicillium* (60,3%), *Fusarium* (48,8%), *Alternaria* (31,4%), *Aspergillus* (6,6%) e *Mucor* (6,6%).

Dos três géneros, testados pela técnica de ISSRs, o género *Cladosporium* foi o que apresentou uma maior taxa de polimorfismo (99,3%), apresentado uma elevada variabilidade intraespecífica, seguido pelo género *Aspergillus* (96,4%) e o género *Penicillium* foi o que apresentou uma menor taxa de polimorfismo (90,1%). Analisando as relações filogenéticas, o género *Penicillium* foi o que obteve uma maior diversidade, seguido de *Cladosporium* e *Aspergillus*.

Os dois isolados identificados como *Talaromyces marneffe*, por técnicas microbiológicas, foram sujeitos à técnica de Nested-PCR e sequenciação, para confirmação da espécie e ambos os resultados deram positivo.

Palavras-chave: Flores; Fungos Filamentosos; ISSRs; PCR; Saúde Pública; *Talaromyces marneffe*.

Abstract

Filamentous fungi present in flowers can be a risk to public health, since they are opportunistic fungi with pathogenic potential, especially for immunosuppressed individuals. Flowers are present in many environments and are commonly offered, used to decorate environments and homes. The mere act of smelling a flower can lead to the inhalation of fungal spores, which may carry the risk of contamination or colonization of the nasal passages or even allow these spores to reach the lower respiratory tract. Thus, screening for filamentous fungi on flowers becomes important.

In this work, 121 flowers of different species were collected at two different locations (Tarouca and Vila Real) and at two seasons (Autumn and Winter). All samples were subjected to fungal culture and isolation of the main genera of filamentous fungi with medical importance and a molecular study was carried out by the ISSR technique. In all samples it was possible to isolate and identify at least one fungal genus, in total, 6 fungal genera and 1 species were identified (*Talaromyces marneffeii*). *Cladosporium* was the predominant genus (99.2%), followed by *Penicillium* (60.3%), *Fusarium* (48.8%), *Alternaria* (31.4%), *Aspergillus* (6.6%) and *Mucor* (6%).

Of the three genera tested by the ISSR technique, the genus *Cladosporium* was the one with the highest polymorphism rate (99.3%), with high intraspecific variability, followed by the genus *Aspergillus* (96.4%) and *Penicillium* genus, which presented lower polymorphism interest rate (90.1%). Analyzing the phylogenetic relationships, *Penicillium* was the one that obtained the highest diversity, followed by *Cladosporium* and *Aspergillus*.

The two isolates identified as *Talaromyces marneffeii*, by microbiological techniques, were submitted to the Nested-PCR technique and sequencing, for confirmation of the species and both results were positive.

Key words: Flowers; Filamentous Fungi; ISSRs; PCR; Public Health; *Talaromyces marneffeii*.

Índice Geral

1. Introdução	1
1.1. Importância dos fungos para a saúde	1
1.2. Características gerais dos fungos	2
1.3. Fungos Filamentosos.....	3
1.3.1. <i>Cladosporium</i> spp.....	4
1.3.2. <i>Alternaria</i> spp.....	6
1.3.3. <i>Aspergillus</i> spp.	7
1.3.4. <i>Penicillium</i> spp.....	10
1.3.5. <i>Talaromyces</i>	11
1.4. Diagnóstico laboratorial	13
1.4.1. Métodos microbiológicos.....	13
1.4.2. Métodos moleculares	13
2. Objetivos.....	16
3. Material e Métodos.....	17
3.1. Colheita de amostras	17
3.2. Meio de cultura de Potato Dextrose Agar (PDA)	17
3.3. Isolamento dos fungos.....	18
3.4. Identificação dos fungos.....	19
3.4.1. Identificação Macroscópica.....	19
3.4.2. Identificação Microscópica	19
3.4.3. Método do Lactofenol com Azul de Algodão	19
3.4.4. Conservação em água destilada esterilizada	20
3.5. Extração de DNA.....	21
3.6. Qualidade do DNA genómico.....	21
3.7. Quantificação do DNA genómico.....	22

3.8. ISSRs e eletroforese em gel de agarose.....	23
3.9. Nested-PCR e eletroforese em gel de agarose	25
3.10. Sequenciação.....	28
3.11. Análise de resultados.....	28
4. Resultados e Análise dos Resultados	30
4.1. Análise microbiológica.....	30
4.1.1. Efeito da Espécie da flor no isolamento fúngico	34
4.1.2. Efeito da Classe da flor no isolamento fúngico.....	34
4.1.3. Efeito da Ordem da flor no isolamento fúngico	36
4.1.4. Efeito da Família da flor no isolamento fúngico	36
4.1.5. Efeito da Época da colheita da amostra no isolamento fúngico	37
4.1.6. Efeito do Local de Colheita.....	38
4.1.7. Isolamento e Identificação de <i>Talaromyces marneffe</i>	38
4.2. Análise molecular	39
4.2.1 ISSRs do género <i>Cladosporium</i>	39
4.2.2. ISSRs do género <i>Aspergillus</i>	40
4.2.3. ISSRs do género <i>Penicillium</i> e da espécie <i>Talaromyces marneffe</i>	42
4.2.4. Análise filogenética a partir dos ISSRs	44
4.2.5. Reação Nested-PCR.....	46
4.2.6. Sequenciação de <i>Talaromyces marneffe</i>	47
5. Discussão	50
6. Conclusão.....	59
7. Referências Bibliográficas.....	61

Índice de Figuras

Figura 1. Características macroscópicas (esquerda) e características microscópicas (direita) do género <i>Cladosporium</i>	5
Figura 2. Características macroscópicas (esquerda) e características microscópicas (direita) do género <i>Alternaria</i>	7
Figura 3. Características macroscópicas (esquerda) e características microscópicas (direita) do género <i>Aspergillus</i>	9
Figura 4. Características macroscópicas (esquerda) e características microscópicas (direita) do género <i>Penicillium</i>	11
Figura 5. Características macroscópicas (esquerda) e características microscópicas (direita) da espécie <i>Talaromyces marneffeii</i>	12
Figura 6. A- Preparado do meio após ferver; B- Placas de Petri com meio de cultura distribuído.....	25
Figura 7. Método do Lactofenol com Azul de Algodão.....	320
Figura 8. Conservação do fungo em água esterilizada.....	33
Figura 9. Gel de agarose e o suporte com o respetivo pente.....	33
Figura 10. A- Colocação da amostra nos poços; B- Gel com as amostras e marcador.....	33
Figura 11. Características microscópicas dos géneros <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> e <i>Mucor</i> , respetivamente.....	33
Figura 12. Características macroscópicas dos isolados do género <i>Cladosporium</i>	33
Figura 13. Características macroscópicas dos isolados do género <i>Penicillium</i>	33
Figura 14. Características macroscópicas dos isolados do género <i>Fusarium</i> , Leveduras e a espécie <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , respetivamente.....	33
Figura 15. Características macroscópicas dos isolados do género <i>Alternaria</i>	35
Figura 16. Características macroscópicas dos isolados do género <i>Aspergillus</i>	35
Figura 17. Características macroscópicas do género <i>Mucor</i>	35
Figura 18. Os dois isolados de <i>Talaromyces marneffeii</i> , características macroscópicas e microscópicas.....	38
Figura 19. Fragmentos de DNA amplificados nas 9 amostras do género <i>Cladosporium</i> com o “primer” UBC811. Legenda: M- Marcador molecular; 1- 14.4; 2- 21.3; 3- 30.2; 4- 36.2; 5- 38.1; 6- 39.1; 7- 42.1; 8- 47.2; 9- 50.2.....	39

Figura 20. Fragmentos de DNA amplificados nas 7 amostras do género <i>Aspergillus</i> com o “primer” UBC889. Legenda: M- Marcador molecular; 1- 36.4; 2- 43.5; 3- 47.3; 4- 52.4; 5- 54.6; 6- 58.5; 7- 66.4.	41
Figura 21. Fragmentos de DNA amplificados nas 10 amostras do género <i>Penicillium</i> e nas 2 amostras da espécie <i>Talaromyces marneffi</i> com o “primer” UBC808. Legenda: M- Marcador molecular; 1- 22.5; 2- 24.2; 3- 25.2; 4- 26.3; 5- 41.5; 6- 45.3; 7- 55.2; 8- 57.3; 9- 97.	43
Figura 22. Dendrograma com as relações filogenéticas entre as 9 amostras do género <i>Cladosporium</i> com base nos ISSRs.....	45
Figura 23. Dendrograma com as relações filogenéticas entre as 7 amostras do género <i>Aspergillus</i> com base nos ISSRs.	45
Figura 24. Dendrograma com as relações filogenéticas entre as 10 amostras do género <i>Penicillium</i> e a espécie <i>Talaromyces marneffi</i> com base nos ISSRs.....	46
Figura 25. A- Gel da 1º Reação de Nested-PCR. B- Gel da 2º Reação de Nested-PCR. Legenda: 1- Amostra 34.1.2; 2- Amostra 119.3.....	47
Figura 26. BLAST da Sequência relativamente ao genoma da amostra 34.1 e percentagem de identidade.....	48
Figura 27. BLAST da Sequência Reverse relativamente ao genoma da amostra 34.1 e percentagem de identidade.....	48
Figura 28. BLAST da Sequência relativamente ao genoma da amostra 119.3 e percentagem de identidade.	48
Figura 29. BLAST da Sequência Reverse relativamente ao genoma da amostra 119.3 e percentagem de identidade.....	49

Índice de Tabelas

Tabela 1. Sequência dos “primers” utilizados.....	23
Tabela 2. Volume dos componentes utilizados a reação de ISSRs.	24
Tabela 3. Condições para a reação de ISSRs.	24
Tabela 4. Volume dos componentes utilizados para a primeira reação de Nested-PCR.	26
Tabela 5. Condições para a primeira reação de Nested-PCR.....	26
Tabela 6. Volume dos componentes utilizados para a segunda reação de Nested-PCR.	27
Tabela 7. Condições para a segunda reação de Nested-PCR.....	27
Tabela 8. Distribuição espécies de flores amostradas.	30
Tabela 9. Distribuição das flores amostradas pela respectiva Ordem.	31
Tabela 10. Distribuição das flores amostradas pela respectiva Família.	31
Tabela 11. Distribuição das flores amostradas pelo mês de colheita.	31
Tabela 12. Ocorrência dos gêneros e espécies fúngicas isoladas nas 121 flores amostradas. .	32
Tabela 13. Distribuição da ocorrência dos diferentes gêneros de fungos filamentosos pelas espécies da flor.	34
Tabela 14. Distribuição da ocorrência dos diferentes gêneros de fungos filamentosos pelas Classes Taxonômicas da flor.....	35
Tabela 15. Distribuição da ocorrência dos diferentes gêneros de fungos filamentosos pelas Ordens Taxonômicas da flor.	36
Tabela 16. Distribuição da ocorrência dos diferentes gêneros de fungos filamentosos pelas Famílias Taxonômicas da flor.....	37
Tabela 17. Distribuição da ocorrência dos diferentes gêneros e espécies de fungos filamentosos pela época da colheita da amostra.	37
Tabela 18. Distribuição da ocorrência dos diferentes gêneros e espécies de fungos filamentosos pela época da colheita da amostra.	38
Tabela 19. Resultados da amplificação e percentagem de polimorfismo de cada “primer” de ISSR para o género <i>Cladosporium</i>	40
Tabela 20. Resultados da amplificação e percentagem de polimorfismo de cada “primer” de ISSR para o género <i>Aspergillus</i>	42
Tabela 21. Resultados da amplificação e percentagem de polimorfismo de cada “primer” de ISSR para o género <i>Penicillium</i> e espécie <i>Talaromyces marneffe</i>	44

Lista de abreviaturas

AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados);

AIDS – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida;

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico);

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana;

ISSR – Inter Simple Sequence Repeat (Entre Repetições de Sequências Simples);

pb – par de bases

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase);

PDA – Potato Dextrose Agar;

RAPD – Random Amplification of Polymorphic DNA (Polimorfismo de DNA Amplificado Aleatoriamente);

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo no Tamanho dos Fragmentos de Restrição);

rRNA – ribosomal Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico ribossômico);

SDA – Sabouraud Dextrose Agar;

SSR – Simple Sequence Repeats (Repetições de Sequências Simples);

TAE – Tris-Acetato-EDTA;

TBE – Tris-Borato-EDTA.

1. Introdução

As flores são colonizadas por uma grande diversidade de espécies de microrganismos, como os fungos, podendo ser vistas como um reservatório de agentes patogénicos (LaCharity e McClure 2003; Haueisen e Stukenbrock 2016).

O ato de oferecer flores está associado a diversas situações do quotidiano, sendo frequentemente e, tradicionalmente oferecidas a indivíduos doentes, podendo constituir um risco na disseminação de agentes com potencial infeccioso como é o caso dos fungos. Devido a este facto, as flores têm sido proibidas nos hospitais, principalmente, em unidades com alto risco de infeção, como por exemplo, unidades de doentes imunodeprimidos e unidades de cuidados intensivos (Prester, 2011; Rafla e Tredget 2011; Gauthier e Keller, 2013), unidades de pacientes oncológicos ou submetidos a transplante de órgãos, uma vez que, estes pacientes ficam suscetíveis a fungos oportunistas (Fisher *et al.*, 2018)

Alguns exemplos podem ser encontrados na bibliografia como por exemplo o apresentado por Kates *et al.* (1991) que efetuaram um estudo em recipientes de flores de três ambientes diferentes, sendo estes, hospitais, restaurantes e jardins privados, tendo encontrado microrganismos semelhantes na água das flores das três fontes. Similarmente, em arranjos de flores foram encontradas, por Warnock *et al.* (2001) espécies de *Aspergillus*, tendo sido considerados uma fonte de esporos de *Aspergillus* no ar de hospitais e do interior de casas.

1.1. Importância dos fungos para a saúde

Geralmente, infeções fúngicas afetam pacientes imunodeprimidos (Prester, 2011), no entanto, podem causar alergias em pacientes imunocompetentes, uma vez que há espécies de fungos que provocam respostas inflamatórias severas (Gauthier e Keller, 2013) e, na maioria das vezes, não se sabe a causa destas reações, uma vez que, não são conhecidos os fatores de risco (Lanternier *et al.*, 2013), visto que, a identificação do agente da infeção com base na manifestação clínica, é impossível na maioria dos casos (Afshari *et al.*, 2017).

Atualmente há um aumento de casos de doenças fúngicas invasivas, que está relacionada com o aumento do número de pessoas suscetíveis, devido ao envelhecimento da

população, às intervenções médicas, como o aumento do uso de vias intravenosas, de terapias imunossupressoras, da taxa de sobrevivência inicial de pacientes oncológicos ou transplantados, à movimentação global de doentes (turismo, peregrinações, trabalho), doenças autoimunes, como a infeção pelo HIV e outros aspetos demográficos (Lanternier *et al.*, 2013; Figueiredo e Neves, 2018; Fisher *et al.*, 2018).

Por outro lado, a resistência de fungos, com potencial patogénico, a fármacos tem aumentado, sendo que a taxa global de mortalidade por doenças/infeções fúngicas é superior à do cancro da mama, da malária, e ainda é semelhante à da tuberculose e do HIV. No entanto, apesar destes factos, as infeções fúngicas são das doenças infecciosas mais negligenciadas (Prakash *et al.*, 2017; Figueiredo e Neves, 2018; Fisher *et al.*, 2018).

Outro fator importante, é o aumento da incidência de asma. Houve um aumento de 30% da incidência a nível global de asma nas últimas décadas, bem como, o aumento das doenças respiratórias alérgicas derivadas de fungos. As alterações climáticas também afetam a esporulação dos fungos, o aumento da temperatura leva à produção mais elevada de esporos e os períodos de chuva facilitam a propagação de esporos e pequenos conídios de fungos. A sensibilização a alérgenos fúngicos pode promover o desenvolvimento ou agravamento de doenças alérgicas, como a asma (Figueiredo e Neves, 2018).

1.2. Características gerais dos fungos

Os fungos são microrganismos eucariotas ubíquos, que podem ser encontrados em qualquer parte da natureza e com uma distribuição mundial, podendo ser unicelulares ou multicelulares que vivem através da decomposição de material orgânico (Bandh *et al.*, 2016; Baxi *et al.*, 2016; Rick *et al.*, 2016; Conti *et al.*, 2018). Estes seres compõem o Reino Fungi, com 8 a 10 filos e, aproximadamente, cerca de 100 000 já sofreram o processo de nomenclatura e enquadramento na taxonomia. Estima-se que existam 1,5 a 3 milhões de espécies em todo o mundo, sendo que 98% das espécies descritas pertencem aos grupos Ascomycota e Basidiomycota, que formam o subreino Dikarya (Rick *et al.*, 2016).

Estes microrganismos ubíquos adaptam-se a uma grande variedade de ambientes, quer externos quer internos (Vacher *et al.*, 2015; Rick *et al.*, 2016), sendo que, a presença de

espécies no ar (espécies anemófilas), a sua adaptação aos meios, o seu crescimento e a sua dinâmica, dependem da temperatura, humidade, porção de materiais derivados de plantas e animais, disponibilidade de nutrientes, exposição a toxinas, hipo e hiperosmolaridade e as interações entre antagonistas e predadores (Vacher *et al.*, 2015; Andrade-Linares *et al.*, 2016).

Estes podem apresentar-se numa forma unicelular, reproduzindo-se por gemulação (leveduras) ou crescem em forma de filamentos multicelulares, também sendo denominados de bolor, com longos filamentos nomeados de hifas, que crescem por extensão apical (Al-Enazi *et al.*, 2018; Conti *et al.*, 2018).

No mundo dos microrganismos, os fungos têm um papel importante e podem ser benéficos na ciência, na indústria e na tecnologia, porém há fungos filamentosos que tem um potencial negativo para humanos e animais, devido ao facto de muitos deles serem fitopatogénicos e micotoxigénicos (Nguyen *et al.*, 2017).

1.3. Fungos Filamentosos

Os fungos filamentosos são um grupo muito diversificado com um grande número de funções nos diversos ecossistemas, crescem em superfícies húmidas, envolvendo a vegetação em decomposição e atuam na reciclagem de nutrientes, tanto em ambientes urbanos como rurais (Andrade-Linares *et al.*, 2016; Conti *et al.*, 2018). Estes seres podem crescer em qualquer material orgânico (Gruber-Dorninger *et al.*, 2016). Apresentam várias propriedades biológicas, como por exemplo, produção de metabolitos secundários, como micotoxinas, que são tóxicas e com um potencial nocivo quer para humanos quer animais (Gruber-Dorninger *et al.*, 2016; Rojas-Aedo, 2018), principalmente, nos géneros, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* e *Fusarium* (Solhaug *et al.*, 2016).

Algumas espécies são capazes de causar doenças nos seres humanos, animais ou espécies vegetais (Menezes *et al.*, 2017). Estas doenças podem ser superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistémicas ou do tipo alérgico (Al-Enazi *et al.*, 2018). Os fungos são transportados pelo ar, quer em forma de esporos, micélios ou fragmentos de hifas. Todas estas formas são diariamente inaladas pelo ser humano e pelos animais e a exposição a estes fungos

pode representar um risco significativo para a saúde de indivíduos predispostos à doença ou indivíduos imunodeprimidos que são suscetíveis à infecção (Prester, 2011; Baxi *et al.*, 2016; Rick *et al.*, 2016; Morán *et al.*, 2017). A exposição a estes, pode levar a problemas respiratórios, frequentemente, ataque de asma, congestão nasal e sinusal, irritação ocular e sinusite (Conti *et al.*, 2018).

Os fungos têm uma grande capacidade de colonizar diferentes substratos e crescer em condições ambientais extremas, fazendo assim parte do ecossistema aerobiológico (Menezes *et al.*, 2017), sendo que os gêneros *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* e *Aspergillus* são dos fungos que estão mais presentes na atmosfera, pois os esporos são transportados pelo ar, demonstraram causar distúrbios alérgicos, com um potencial de agente patogénico e sensibilizar os pacientes (Docampo *et al.*, 2010; Fatahinia *et al.*, 2018; Rotondo *et al.*, 2018).

Mais de 70 alérgenos foram isolados, mas os números de pacientes com distúrbios alérgicos têm vindo a aumentar (Docampo *et al.*, 2010), sendo considerado um problema no setor de saúde (Rick *et al.*, 2016). A exposição a fungos filamentosos leva a um risco de doenças infecciosas, sensibilização e desenvolvimento de alergias e efeitos irritantes e tóxicos (Kespohl e Raulf, 2014).

1.3.1. *Cladosporium* spp.

O género *Cladosporium* spp, contendo 651 espécies, pertence à família Davidiellaceae, ordem Capnodiales, classe Dothideomycetes e filo Ascomycota (Weryszko-Chmielewska *et al.*, 2017). É um dos fungos mais heterogéneos e com várias espécies geneticamente e morfológicamente distintas, sendo também um dos mais isolados do ambiente (Bensch *et al.*, 2012; Asl *et al.*, 2017; Menezes *et al.*, 2017). Este género é frequentemente, isolado do ar, solo, têxteis, alimentos, tintas, plantas, material vegetal e outros detritos, em qualquer localização geográfica (Bensch *et al.*, 2012; Razafinarivo *et al.*, 2016; Menezes *et al.*, 2017).

É dos mais cosmopolitas na distribuição e de maior concentração na atmosfera, especialmente em regiões temperadas, sendo agentes de decomposição e causadores de

alergias ou doenças quer em plantas, em animais ou em humanos (Bensch *et al.*, 2012; Asl *et al.*, 2017; Menezes *et al.*, 2017).

Os esporos deste género são poluentes atmosféricos biológicos que representam perigo para a saúde humana (Weryszko-Chmielewska *et al.*, 2017), havendo espécies que têm reconhecimento médico em laboratórios clínicos, em situações de micoses pulmonares alérgicas, infeções subcutâneas, e por vezes, infeções disseminadas (Bensch *et al.*, 2012; Asl *et al.*, 2017). Sendo agentes com potencial alergénico, grandes quantidades destes esporos, podem afetar pessoas asmáticas ou com doenças respiratórias, quando há uma exposição prolongada, pois, enfraquece o sistema imunológico (Menezes *et al.*, 2017). Contudo, estes raramente causam infeções, são mais caracterizados como alergénios (Rick *et al.*, 2016).

Os esporos de *Cladosporium* são de reduzidas dimensões, cerca de 3-35 µm e dominam os bioaerossóis atmosféricos. Devido às suas características atingem facilmente o trato respiratório inferior, irritando as vias respiratórias. Estes são constituídos por várias proteínas que provocam alergias no ser humano (Weryszko-Chmielewska *et al.*, 2017).

Os conidióforos de *Cladosporium* são específicos, podendo ser retos, eretos ou geniculados (dobra em angulo agudo, em forma de joelho), usualmente, criam abundantes cadeias ramificadas de conídeos verde-azeitona a castanho (Figura 1), estando bem adaptados para se dispersarem facilmente e em grandes números por longas distâncias (Bensch *et al.*, 2012; Asl *et al.*, 2017), são também hifomicetos demaciados (Bensch *et al.*, 2015). Estes conídios são representativos da componente fúngica mais frequente isolada do ar (Bensch *et al.*, 2012).

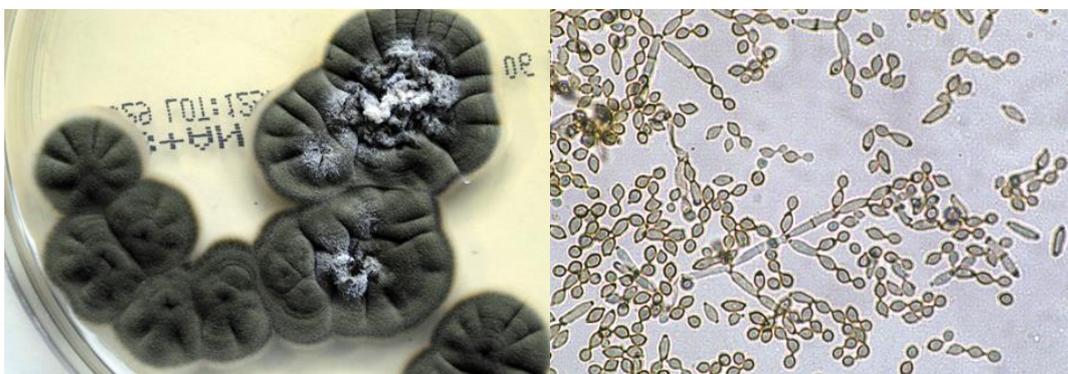


Figura 1. Características macroscópicas (esquerda) e características microscópicas (direita) do género *Cladosporium* (Adaptado de: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/cladosporium/>).

1.3.2. *Alternaria* spp.

O género *Alternaria* é um fungo cosmopolita (Rodríguez *et al.*, 2015) e oportunista que afeta pacientes imunodeprimidos, podendo em casos raros, afetar indivíduos saudáveis (Hu *et al.*, 2015), é ecologicamente diverso, tendo uma distribuição mundial e é associado a substratos naturais e artificiais, incluindo sementes, plantas, produtos agrícolas, animais, solo e atmosfera (Lawrence *et al.*, 2013; Woudenberg *et al.*, 2013; da Cruz Cabral *et al.*, 2017). É um género que, frequentemente, é relacionado a alergias e ao agravamento da asma, sendo que a prevalência de alergias varia com as regiões geográficas (Kustrzeba-Wójcicka *et al.*, 2014).

Este é o principal aeroalergénio asmático que afeta quer crianças que adultos em todo o mundo, em especial, a espécie *Alternaria alternata* (Prester, 2011; Rotondo *et al.*, 2018), que é um dos mais encontrados em todo o mundo, sendo esta espécie responsável por infeções do trato respiratório superior e asma em humanos (Woudenberg *et al.*, 2015; Gabriel *et al.*, 2016).

São fungos patogénicos ubíquos que podem infetar humanos, animais e plantas, incluindo espécies fitopatogénicas e saprófitas que afetam plantas ornamentais e de cultura no campo causam a podridão pré e pós-colheita dos frutos e dos grãos e são associadas a doenças de plantas (Lawrence *et al.*, 2013; Woudenberg *et al.*, 2013; Andersen *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2015; Xiang *et al.*, 2017; Siciliano *et al.*, 2018; Tralamazza *et al.*, 2018).

Podem sintetizar mais de 70 metabolitos secundários, mas só alguns são caracterizados como tóxicos para humanos e animais (Asam e Rychlik, 2015; Rodríguez *et al.*, 2015; López *et al.*, 2016; Solhaug *et al.*, 2016; da Cruz Cabral *et al.*, 2017; Xiang *et al.*, 2017; Tralamazza *et al.*, 2018), estas micotoxinas, provocam patologias vegetais, que vai por em risco a qualidade e segurança alimentar (Andersen *et al.*, 2015). As espécies de *Alternaria* podem ser encontradas em diferente habitats e regiões do planeta, e assim, produzir diferentes metabolitos e logo, o potencial tóxico vai ser diferente (Andersen *et al.*, 2015). As espécies, *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria* sp. e *A. japónica*, são as mais relevantes que produzem metabolitos secundários tóxicos (Solfrizzo, 2017).

Os esporos de *Alternaria* são dos esporos mais comuns e alergénicos transportados pelo ar (Lawrence *et al.*, 2013), são predominantemente alergénios externos, podendo

também ocorrer em ambiente interno (Kustrzeba-Wójcicka *et al.*, 2014; Rotondo *et al.*, 2018), são associados a paragens respiratórias, podendo ser fatais (Rotondo *et al.*, 2018), e a sensibilização a estes alergénios foram considerados um dos fatores para o início de asma infantil em regiões de deserto/áridas (Lawrence *et al.*, 2013; Rotondo *et al.*, 2018), também podem causar rinoconjuntivite alérgica e podem provocar ou agravar ataques de asma (Fernández-Rodríguez *et al.*, 2015). Os esporos de *A. alternata* são considerados dos alergénios mais fortes e sensibilizadores do ar (Gabriel *et al.*, 2016). O principal meio de dispersão dos conídios é através de correntes de ar, mas também se verificou a dispersão por respingos de chuva (Fernández-Rodríguez *et al.*, 2015).

O género *Alternaria* contém cerca de 275 espécies, organizadas em 13 grupos/27 seções de espécies (Woudenberg *et al.*, 2013; da Cruz Cabral *et al.*, 2017; Tralamazza *et al.*, 2018). Apresentam colónias de cor escura, num espectro de cinza a castanho e cor de oliveira, com conídios grandes, com septos transversais e longitudinais que aparecem em cadeias ou isoladamente, com um bico apical alongado ou células apicais afiladas (Figura 2) (Lawrence *et al.*, 2013; Woudenberg *et al.*, 2013; Tralamazza *et al.*, 2018).



Figura 2. Características macroscópicas (esquerda) e características microscópicas (direita) do género *Alternaria* (Adaptado de: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/cladosporium/>).

1.3.3. *Aspergillus* spp.

O género *Aspergillus* é dos organismos mais abundantes e distribuídos pelo mundo, contendo cerca de 350 espécies (Kocsubé *et al.*, 2016), pertencem à ordem Eurotiales (Tsang *et al.*, 2018) e à classe Ascomycota, reproduzindo-se assexuadamente (Nguyen *et al.*, 2017).

Aspergillus são um dos nomes mais antigos na taxonomia fúngica, e o seu nome deriva de *aspergillum*, que é um aspersor usado pela igreja católica para pulverizar água benta, que se assemelha aos conidióforos deste género (Figura 3) (Kocsubé *et al.*, 2016; Tsang *et al.*, 2018). São saprófitas e podem ser encontrados em grandes quantidades em material decomposto, compostos orgânicos, em substratos degradantes, tecidos humanos, no solo, no ar e poeira (Nguyen *et al.*, 2017).

Apesar de muitos benefícios favoráveis em biotecnologia e tecnologia de alimentos, o género *Aspergillus* está associado a doenças críticas de seres humanos e animais (Nguyen *et al.*, 2017). São várias as espécies de *Aspergillus* que podem ser capazes de produzir metabolitos tóxicos para humanos, animais e plantas (Nguyen *et al.*, 2017), habitualmente, relacionados como contaminantes de origem alimentar ou como agentes causadores de micoses (Kocsubé *et al.*, 2016).

As estirpes são das mais estudadas devido aos seus papéis no ecossistema e pela patogenicidade que apresentam (Nguyen *et al.*, 2017). *Aspergillus* produzem grandes quantidades de esporos (Nguyen *et al.*, 2017), apresentam interesse clínico e estão associados a doenças respiratórias e outras patologias, como por exemplo, diferentes formas de aspergilose (Docampo *et al.*, 2010). Aspergilose invasiva uma infeção de elevada prevalência que afeta, principalmente, indivíduos imunodeprimidos (Garcia-Vidal *et al.*, 2014; Morán *et al.*, 2017). As taxas de mortalidade de aspergilose invasiva é de 40 a 90% (Garcia-Vidal *et al.*, 2014) e a aspergilose cerebral, embora muito rara, têm uma taxa de mortalidade de cerca de 90% (Imbert *et al.*, 2017).

Este é o causador mais proeminente de infeções pulmonares de origem fúngica (Rick *et al.*, 2016). Indivíduos imunocompetentes apresentam infeções superficiais ou localizadas, enquanto que, indivíduos imunodeprimidos apresentam mais complicações, como um maior risco de doenças disseminadas e invasivas e podendo levar à morte (Bandh *et al.*, 2016).

Nem todas as espécies deste género apresentam o mesmo grau de toxicidade, patogenicidade ou capacidade alérgica (Bandh *et al.*, 2016). A espécie *A. fumigatus* é dos fungos que causam mais patologias graves em hospedeiros imunodeprimidos (Conti *et al.*, 2018), é a espécie patogénica mais conhecida a nível mundial, sendo o agente etiológico para a maioria dos casos de aspergilose (Tsang *et al.*, 2018). Esta espécie pode causar aspergilose broncopulmonar alérgica, rinosinusite alérgica, sinusite e asma em pacientes

imunocompetentes (Prester, 2011; Morán *et al.*, 2017). *A. fumigatus* é um fungo saprófita, o seu habitat mais comum é no solo, mas sobrevive e cresce numa grande variedade de restos orgânicos, os esporos destes são ubíquos, esta característica deve-se á facilidade de dispersão dos conídeos e devido ao seu pequeno tamanho (2 a 3 µm de diâmetro), os conídeos podem permanecer suspensos no ar por um longo período de tempo, e assim, ampliando a probabilidade de inalação (Morán *et al.*, 2017). Existem mais de 100 géneros fungos com poder alergénico, mas esta espécie produz mais moléculas alergénicas do que qualquer outra espécie (Prester, 2011).

A maioria das aspergiloses invasivas é provocada por *A. fumigatus* (Chong *et al.*, 2017; Frías-De-León *et al.*, 2018), mas têm surgindo aspergiloses invasivas provocadas por *A. niger*, porém, este é considerado de baixa virulência, apesar de ser isolado com elevada frequência (Frías-De-León *et al.*, 2018).

Existe uma grande variedade de agentes patogénicos relacionados com infeções fúngicas invasivas que causam morbidade e mortalidade em pacientes com fatores de risco subjacentes, mas espécies do género *Aspergillus* são predominantes (Blum *et al.*, 2013).

Aspergillus produz micotoxinas que podem afetar a saúde humana e animal, algumas espécies são conhecidas como produtores de micotoxinas, nomeadamente, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. terreus* (Zulkifli e Zakaria, 2017).

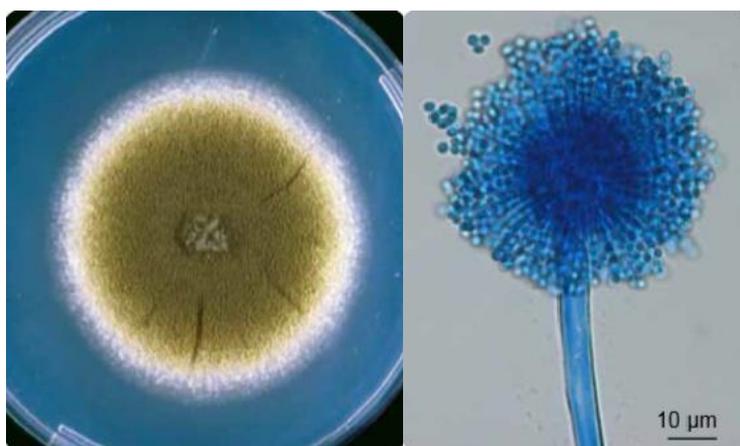


Figura 3. Características macroscópicas (esquerda) e características microscópicas (direita) do género *Aspergillus* (Adaptado de: Kidd *et al.*, 2016).

1.3.4. *Penicillium* spp.

O género *Penicillium*, pertence à ordem Eurotiales e à classe Ascomicetos, contém cerca de 400 espécies descritas (Nguyen *et al.*, 2017; Yin *et al.*, 2017). É dos géneros fúngicos mais importantes, mais comum e bem conhecido, com uma distribuição mundial e presença numa grande diversidade de habitats, desde o solo, ar, vegetação, ambientes internos e produtos alimentares. Apresenta espécies com uma grande variabilidade intraespecífica (Visagie *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2017; Abdelwahab *et al.*, 2018), podem ter uma associação forte com um substrato específico (Barbosa *et al.*, 2018) e ainda podem habitar em vários nichos ambientais, tendo assim várias vias de contaminação transmissão e formas de contaminação (Groot *et al.*, 2018).

É um fungo oportunista, reproduzindo-se quer assexuadamente como sexuadamente (Nguyen *et al.*, 2017). Algumas espécies são descritas como “bolor azul”, devido à esporulação visível ter uma cor azul esverdeada e o nome provem do latim “*penicillus*”, devido à forma dos conidióforos se parecerem com um pincel de pintor (Figura 4) (Houbraken and Samson, 2011; Yin *et al.*, 2017).

Produzem uma grande quantidade de conidiósporos que são encontrados em grandes quantidades no ar e em habitações e a maioria das espécies encontram-se no solo, principalmente, vegetais em decomposição, mas podem-se desenvolver numa ampla gama de condições (Nguyen *et al.*, 2017).

A principal função deste fungo é a decomposição de matérias orgânicos, e às espécies que causam apodrecimento e produzem micotoxinas (Visagie *et al.*, 2014). A podridão (bolor azuis e verdes) encontrada em várias frutas e vegetais derivam deste género, também é encontrado em produtos de origem animal processada e contamina vários tipos de produtos, quer alimentares quer não alimentares, mas só alguns são conhecidos por provocar doenças em humanos e animais (Nguyen *et al.*, 2017). Para além de provocarem podridão, secreta micotoxinas que provocam a penicilose, a maioria das espécies só produzem uma micotoxina, mas algumas são capazes de produzir várias ao mesmo tempo (Nguyen *et al.*, 2017). Além disso, ainda produz uma grande variedade de compostos químicos, muitos dos quais são considerados com um grau de toxicidade elevado (Nguyen *et al.*, 2017).

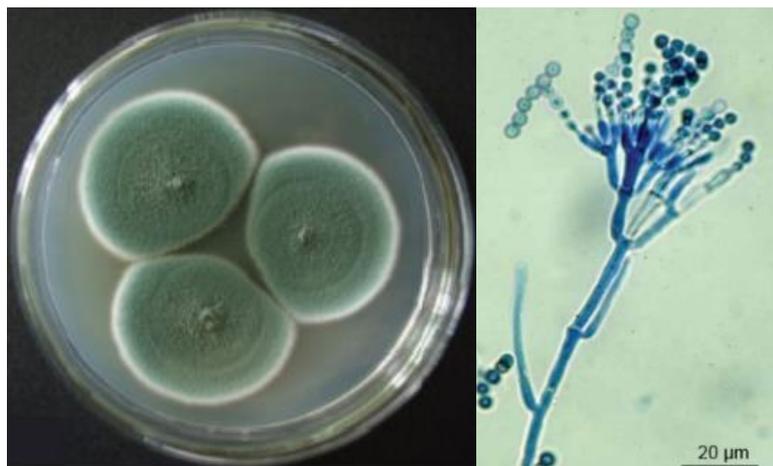


Figura 4. Características macroscópicas (esquerda) e características microscópicas (direita) do género *Penicillium* (Adaptado de: Lin et al., 2012 e Kidd et al., 2016, respetivamente).

1.3.5. *Talaromyces*

Antes de 2012, *Talaromyces* era caracterizado como um género sexuado, que pertencia ao género *Penicillium*, mas atualmente, estes dois géneros foram separados, e anteriormente conhecido por *Penicillium marneffe* passou a *Talaromyces marneffe* (Barbosa et al., 2018).

Este género pertence à ordem Eurotiales (Tsang et al., 2018), contém 88 espécies e pode ter uma forte associação a um substrato específico (Barbosa et al., 2018). Segundo Vanittanakom et al. (2006), a rota mais significativa de transmissão é pelo contacto com os esporos no solo durante períodos de chuva, ou por infeção direta com o local da ferida. Os conídios desta espécie quando inalados são considerados infecciosos, podendo causar micose sistémica fatal (Hu et al., 2013).

Talaromyces marneffe é um fungo patogénico dimórfico (Lanternier et al., 2013; Lu et al., 2015), que se apresenta na forma de hifas no ambiente e como leveduras no sangue e nos tecidos (Lanternier et al., 2013). É dimórfico (Wong et al. 2018) e com as mudanças de temperatura, este fungo muda da forma de hifa para levedura e vice-versa (Lanternier et al., 2013). Na forma de hifa, as colónias têm pigmentos amarelos e verdes e há uma difusão com o agar tornando vermelho (Figura 5) (Wong et al., 2018).

É a única espécie dimórfica do género *Talaromyces*, endémico na Ásia, em especial, Tailândia, China, Hong Kong e Taiwan e é um fungo parasitário e patogénico emergente, que em certas circunstâncias raras pode infectar seres humanos imunocompetentes (Vanittanakom *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2015; Chi *et al.*, 2017; Si e Qiao 2017; Wang *et al.*, 2018).

A talaromicose, anteriormente conhecida por peniciliose, é um tipo de doença infecciosa fúngica causada pelo fungo *T. marneffei*, e apresenta sinais clínicos complexos e difíceis de detetar e que por muitas vezes leva a erros no diagnóstico, levando a uma elevada taxa de mortalidade (Vanittanakom *et al.*, 2002; Thanh *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018). Em doentes imunodeprimidos estas infeções são oportunistas, causadora de infeções sistémicas em pacientes com imunidade mediada por células prejudicadas e é associada à síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) causada por infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), onde é uma micose grave com uma elevada taxa de mortalidade (Hu *et al.*, 2013; Tsang *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2018) e talaromicose é a terceira infeção oportunista mais comum em HIV, causando morte entre os pacientes (Hu *et al.*, 2013; Chi *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2018), sendo que Zhang *et al.* (2017) relata, que tem vindo a aparecer micoses sistemáticas em pacientes sem infeção pelo HIV, sendo que apresentavam condições imunodeprimidas (Wong *et al.*, 2018).



Figura 5. Características macroscópicas (esquerda) e características microscópicas (direita) da espécie *Talaromyces marneffei* (Adaptado de: Wong *et al.*, 2018 e Headley *et al.*, 2017, respetivamente).

1.4. Diagnóstico laboratorial

1.4.1. Métodos microbiológicos

A técnica convencional de cultura com posterior visualização em lâmina para uma análise detalhada em microscópio de fungos filamentosos é um dos principais métodos de identificação morfológica de fungos em laboratórios de diagnóstico (Prakash e Bhargava, 2016). A utilização de meios de cultura de agar para microrganismos têm sido os mais comumente utilizados (Nonaka *et al.*, 2014), sendo os Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e Potato Dextrose de Agar (PDA) (Sahu *et al.*, 2014) os meios mais usados na detecção de infecções fúngicas.

Potato Dextrose Agar (PDA) é um dos meios de cultura escolhidos para estudar fungos filamentosos, tendo vantagens, como a facilidade de manuseio, flexibilidade, não necessita de muito espaço durante a incubação, tempo de resposta com uma certa rapidez e sem muitos custos (Prakash e Bhargava, 2016). Este meio é utilizado para isolamento e identificação de leveduras e fungos filamentosos, ocorre um crescimento exuberante de fungos, levando à esporulação destes e à produção de pigmentos (Liofilchem® - Potato Dextrose Agar). Fungos isolados em meios de PDA apresentam colónias com um crescimento relativamente rápido e é um meio transparente (Manganyi *et al.*, 2018), que ajuda na observação dos pigmentos formados (Prata, 2007).

1.4.2. Métodos moleculares

Os métodos moleculares são mais específicos e precisos em comparação com os métodos microbiológicos, este facto, deve-se à diversidade e semelhança presente entre as diferentes espécies dentro dos géneros (Afshari *et al.*, 2017; Asl *et al.*, 2017; Kumar and Mugunthan, 2017). É importante ter DNA de boa qualidade, para que os testes sejam bem-sucedidos, incluindo a amplificação de diferentes regiões de DNA para posterior sequenciação ou o uso de marcadores genéticos mais sensíveis e específicos (Serna-Domínguez *et al.*, 2018).

Os fungos possuem uma parede celular rígida, laminada e complexa que protege e fornece firmeza às suas estruturas celulares e é abundante em inibidores, o que torna a extração de ácidos nucleicos difícil (Kumar e Mugunthan, 2017; Serna-Domínguez *et al.*, 2018). Os protocolos convencionais apresentam algumas desvantagens, como, tempo consumido, necessidade de grandes quantidades de amostra, alto nível de especialização e produtos químicos tóxicos, mas em contrapartida fornecem uma maior quantidade de DNA. Por outro lado, existem *kits* comerciais de extração de DNA que permitem a obtenção de DNA de boa qualidade para utilizar em PCR, e ao contrário do protocolo convencional, só necessita de pequenas quantidades de amostras, menos tempo consumido, mas por outro lado, implica mais custos e menor quantidade de DNA obtido (Serna-Domínguez *et al.*, 2018). A pureza do DNA é importante em ensaios de PCR, uma vez que, se a pureza de DNA for baixa, pode afetar ou inibir a reação (Rico-Munoz *et al.*, 2018).

Não existe um marcador molecular ideal e este, refere-se a “qualquer diferença detetável que identifique uma região específica do genoma” (Xu, 2006). Existem diversos tipos de marcadores moleculares (incluindo ISSR, RAPD, AFLP, RFLP e SSR). Os ISSRs obtêm-se através da amplificação de sequências entre repetições de sequências simples (microsatélites) em múltiplos *loci* no genoma por um único “primer” e cada banda amplificada corresponde a um *locus* (Sibao *et al.*, 2005; Khan, 2015). Os “primers” podem ter várias combinações de repetições dinucleotídeos, trinucleotídeos e pentanucleotídeos, e assim, tendo múltiplos *loci* genómicos para amplificar sequências de ISSRs de vários tamanhos (Estrada *et al.*, 2007; Mahmoud *et al.*, 2016). Este método é rápido e reproduzível, ao contrário dos RAPDs, mais rápido e mais barato do que os AFLPs e RFLPs, e apresenta menor complexidade do que os SSRs (Mahmoud *et al.*, 2016). Os ISSRs parecem ser marcadores genéticos ideais para vários estudos, principalmente sobre variação genética, variabilidade e relações filogenéticas (Ng e Tan, 2015).

Estudos com ISSRs já foram realizados para estudar a diversidade genética, estrutura populacional e relações filogenéticas de isolados aflatoxigénicos e não-aflatoxigénicos de *Aspergillus flavus* (Al-Wadai *et al.*, 2013; Mahmoud *et al.*, 2014; Divakara *et al.*, 2015) em isolados do ar, de plantas (Mahmoud *et al.*, 2016), de culturas de trigo (Al-Wadai *et al.*, 2013), de grãos de milho (Mahmoud *et al.*, 2014; Houshyarfardet *et al.*, 2015), em pistacho, em amendoim (Houshyarfardet *et al.*, 2015) e em sementes de sorgo (Divakara *et al.*, 2015).

Para a espécie *T. marneffe*, o nested-PCR é utilizado para uma identificação sensível, rápida (Liu *et al.*, 2016) e específica para a espécie, utilizando “primers” baseados na sequência do gene 18S rRNA ou na região ITS1-5.8S-ITS2 rDNA (Chaiwun *et al.*, 2011). Este método consiste em duas reações com “primers” que amplificam sequências específicas, sendo que na primeira reação, os “primers” amplificam uma porção maior que é específica para fungos e na segunda reação amplificam dentro da anterior uma porção específica de *T. marneffe* (Chaiwun *et al.*, 2011).

Nested PCR já foi utilizado para identificação de *Talaromyces marneffe* em estudos com amostras de sangue total (Lu *et al.*, 2016), amostras de tecido embebidos em parafina (Zeng *et al.*, 2009), amostras de tecido fresco e fluido de lavagem broncoalveolar (Liu *et al.*, 2016), amostras de soro sanguíneo (Pongpom *et al.*, 2009), em isolados em humanos, ratos de bambu e solo (Vanittanakom *et al.*, 2002) e em amostras de pulmão (Headley *et al.*, 2017).

Contudo, para uma identificação mais precisa, apesar de mais trabalhosa, das espécies e análise de variações entre espécies, é utilizado o método de sequenciação do produto de PCR (Xu, 2006). Farkas (2014) considera que a PCR tem sido usada na detecção de agentes infecciosos em todos os laboratórios de microbiologia e a sequenciação é considerada o teste de laboratório final. A tecnologia de reação em cadeia da polimerase (PCR), a análise de sequenciação de alvos e obtenção de dados sobre a genética estrutural e a variação das populações fúngicas, levam a um melhor entendimento da epidemiologia dos fungos e estes métodos são usadas para uma detecção rápida e precisa (Afshari *et al.*, 2017; Asl *et al.*, 2017).

2. Objetivos

Os fungos filamentosos presentes nas flores podem ser um risco para a saúde pública, uma vez que são fungos oportunistas e patogênicos, em especial para indivíduos imunodeprimidos. As flores estão presentes em muitos ambientes e são comumente oferecidas e utilizadas para enfeitar ambientes e casas, levando a um risco de contaminação e tornando assim importante o rastreamento de fungos filamentosos em flores.

Neste trabalho efetuou-se a colheita de flores de várias espécies, em dois locais diferentes e em duas épocas do ano, com o objetivo de:

- Isolar fungos presentes na superfície das flores;
- Identificar o gênero dos isolados obtidos;
- Analisar a ocorrência dos fungos filamentosos nas flores;
- Estudar a variabilidade genética dos gêneros fúngicos (*Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus*) através de marcadores moleculares (ISSRs);
- Identificar a espécie *Talaromyces marneffe* através da técnica nested-PCR, utilizando “primers” específicos e a sequenciação do produto do PCR para confirmação.

3. Material e Métodos

3.1. Colheita de amostras

Neste estudo efetuou-se a pesquisa de fungos filamentosos em flores de corte entre setembro de 2017 e março de 2018, pertencentes a 121 flores de jardim de Vila Real e Tarouca, dentro das quais, 2 Azáleas, 22 Petúnias, 32 Rosas, 11 *Lychnis*, 2 Dálias, 10 Crisântemos, 25 Camélias, 5 Bergénias, 2 Jacintos e 10 Narcisos.

A colheita de amostras consistiu no contacto direto de uma placa de Petri com PDA e as pétalas da flor durante 30 segundos. Posteriormente, estas placas foram seladas, mantidas à temperatura de 28°C e enviadas para o Laboratório de Microbiologia Médica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. De seguida, identificou-se as placas com um código que permitiu saber a qual flor correspondia e deixou-se a cultura fúngica crescer durante 4 a 7 dias à temperatura de 25-28°C. Todo o processo laboratorial foi executado num ambiente asséptico, e todas as regras de biossegurança foram cumpridas.

3.2. Meio de cultura de Potato Dextrose Agar (PDA)

O meio de cultura utilizado foi o Potato Dextrose Agar (PDA). Este meio permite o crescimento de todos os fungos filamentosos e promove a esporulação do mesmo, o que facilita a sua identificação. Para a preparação deste, foram pesados 42 g de PDA (Liofilchem®) tendo sido este dissolvido em 1L de água destilada num Erlenmeyer, conforme descrito pelo fabricante no rótulo da embalagem. De seguida, colocou-se um agitador magnético e fechou-se o Erlenmeyer e levou-se a homogeneizar numa placa de agitação. Para uma melhor homogeneização foi colocado em banho-maria até ficar translúcido. Depois deste procedimento, o meio preparado foi esterilizado num autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Após a autoclavagem, o meio foi colocado numa câmara de fluxo laminar, onde foi transferido para as respetivas placas de Petri (figura 6), que foram previamente esterilizadas

em UV na mesma câmara de fluxo laminar. Após a distribuição e arrefecimento do meio, as placas foram identificadas com o nome do meio de cultura e com a data e colocadas no frigorífico até a sua utilização.

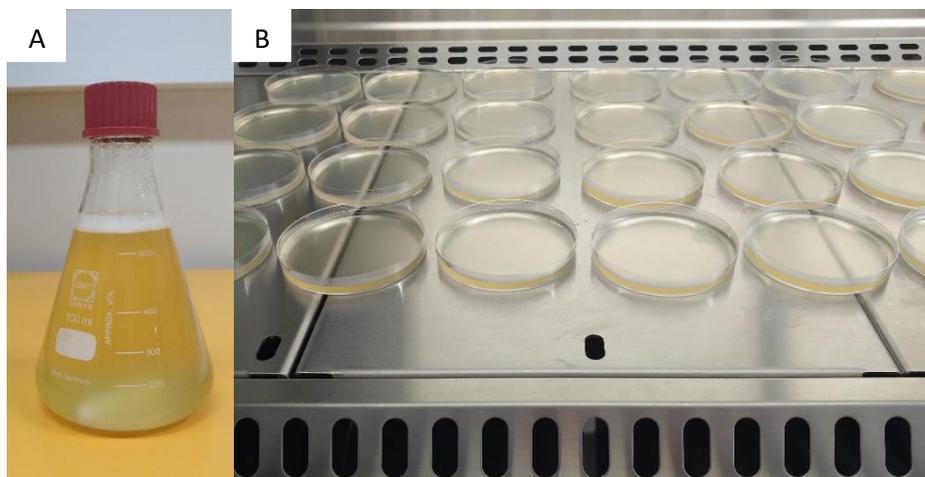


Figura 8. A- Preparado do meio após ferver; B- Placas de Petri com meio de cultura distribuído (fotografias do autor).

3.3. Isolamento dos fungos

Após o crescimento da cultura fúngica, verificou-se o crescimento de uma variedade de fungos e por vezes bactérias. Para caracterizar individualmente um fungo é necessário obtê-lo em cultura pura, para isso efetuou-se a repicagem dos mesmos.

Para a repicagem, procedeu-se a extração de uma pequena porção do fungo juntamente com o meio com uma ansa previamente esterilizada, seguindo-se a sua colocação numa nova placa de Petri com o meio PDA. Este procedimento, realizou-se sempre junto à chama do bico de Bunsen.

De seguida, colocou-se o meio de cultura entre 4 a 7 dias, à temperatura de 25-28°C para que houvesse um novo crescimento fúngico e fossem obtidas colónias perfeitamente individualizadas. As placas com a cultura eram observadas diariamente.

3.4. Identificação dos fungos

A identificação fúngica foi realizada a partir de observações macroscópicas e microscópicas das características e componentes estruturais dos fungos isolados, recorrendo-se a um endereço eletrónico sobre micologia médica pertencente à Universidade de Adelaide (<http://www.mycology.adelaide.edu.au>) e ao livro “*Descriptions of Medical Fungus*” (2016).

3.4.1. Identificação Macroscópica

A análise macroscópica corresponde à análise do verso e reverso da placa de Petri utilizando parâmetros de comparação de cor e textura das colónias. Esta análise pode ser muito variada em termos de aspeto.

3.4.2. Identificação Microscópica

Para que seja possível fazer a completa identificação da colónia fúngica em estudo, após a identificação macroscópica fez-se a análise microscópica do fungo. Esta análise baseia-se na preparação de uma lâmina com uma pequena porção da estrutura do fungo e de seguida, a observação microscópica do mesmo.

3.4.3. Método do Lactofenol com Azul de Algodão

Para que a observação microscópica seja bem-sucedida utiliza-se um corante que permita a distinção das diferentes estruturas dos fungos e que possibilite a identificação do mesmo, foi utilizado o corante Lactofenol com Azul de Algodão.

Este método foi realizado em condições de assepsia e consiste em retirar uma lâmina do frasco com álcool a 70% e de seguida flamejada no bico de Bunsen. Posteriormente, deixou-se secar em cima de papel absorvente. Identificou-se a lâmina com o código definido para a amostra em questão e colocou-se uma gota do corante Lactofenol com azul de algodão na lâmina (Figura 7.A). Depois desta preparação, cortou-se uma tira de fita-cola e com o auxílio de uma pinça, pressionou-se a tira de fita-cola contra o fungo para que este adira à fita-cola (Figura 7.B). Deve-se decalcar uma parte mais externa, uma vez que apresenta menor esporulação do fungo. Esta foi colocada na lâmina, em cima da gota de corante (Figura 7.C e D). De seguida, procedeu-se à identificação microscópica na objetiva de 40x, analisando as características estruturais e comparando com as fontes anteriormente indicadas.

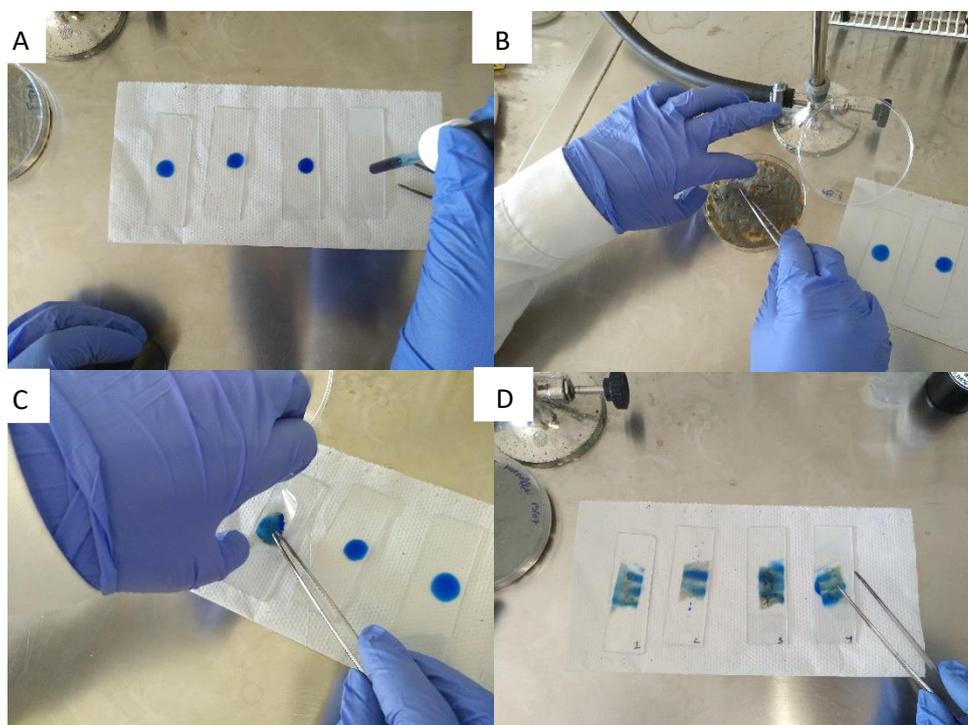


Figura 7. Método do Lactofenol com Azul de Algodão (fotografias do autor).

3.4.4. Conservação em água destilada esterilizada

Para que os fungos pudessem ser submetidos a PCR, teve que ser feita a sua conservação em água destilada esterilizada. Para tal, colocou-se num tubo água destilada, que posteriormente, foram esterilizados na autoclave. Posteriormente, na presença do bico de Bunsen e com o auxílio da ansa, previamente esterilizada, retirou-se o fungo, através de

raspagem, tendo o cuidado para que não seja removido meio de cultura, e coloca-se no tubo com a água destilada devidamente identificado fechando hermeticamente em seguida (Figura 8).

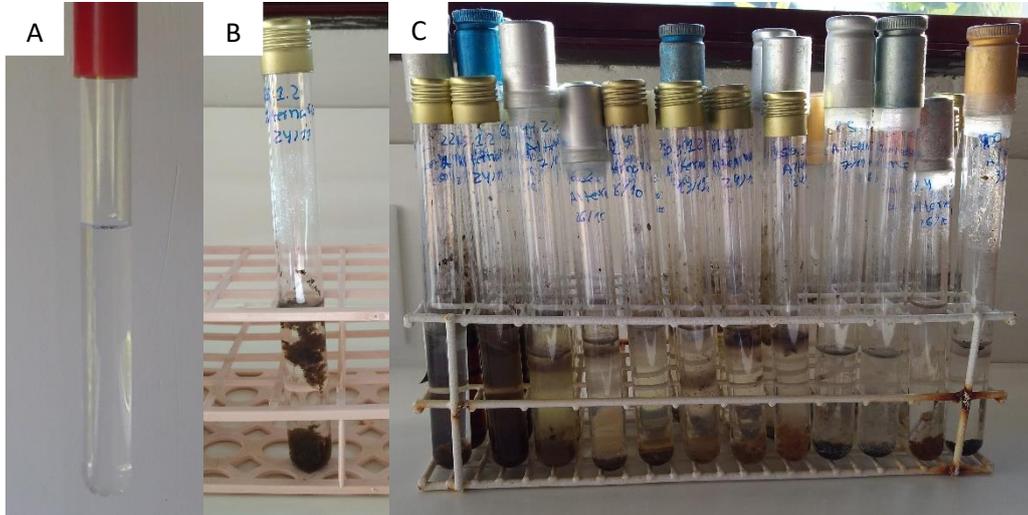


Figura 8. Conservação do fungo em água esterilizada (fotografias do autor).

3.5. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada por dois protocolos diferentes, um protocolo do kit Plant/Fungi DNA Isolation Isolation Kit # 26200 (Norgen Biotek Corp.), seguindo o protocolo fornecido no mesmo, com algumas modificações e um protocolo pelo método de CTAB, apresentados em Anexo (Anexo I).

3.6. Qualidade do DNA genómico

Depois da extração verificou-se a qualidade do DNA extraído, com uma análise em gel de agarose (1%). Foram pesados 0,8 g de agarose (SeaKem®) e adicionados 80 mL de TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA, Nzytech®), sendo esta dissolvida por aquecimento até à ebulição. De seguida, adicionou-se 3 µL de GreenSafe (Nzytech®) à solução anterior, e deixou-se arrefecer um pouco, sendo depois, depositada num suporte horizontal onde se

colocou um pente, para a formação de poços para a deposição das amostras (Figura 9). Após polimerizar, o gel foi colocado numa tina de eletroforese e submerso em TAE. De seguida, adicionou-se 4 μL de solução de deposição (11,5 mL de glicerol, 0,005 g de azul de bromofenol, 8,5 mL de TBE10X) a 5 μL de amostra. Nos poços das extremidades foram depositados 3 μL de marcador molecular (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific®) e nos restantes poços foram depositadas as amostras com a solução de deposição. De seguida, o gel foi sujeito a uma eletroforese a 100V durante cerca de 30 minutos. Para visualização do gel, efetuou-se a captação de imagem através do equipamento Molecular Imager Gel Doc™ XR + With Image Lab™ software da BioRad.



Figura 9. Gel de agarose e o suporte com o respetivo pente (fotografias do autor).

3.7. Quantificação do DNA genómico

A quantificação do DNA genómico foi feita no equipamento Biotek® powerwave XS2 acoplado do programa gen5®, utilizando 2 μL de amostra. As leituras da absorvência a 260 nm, e a 280 nm permitiram calcular a quantidade de DNA e o valor da sua pureza. As amostras foram diluídas para uma concentração de DNA de 5 ng/ μL , à exceção de *Talaromyces marneffe* que foi diluído para uma concentração de DNA de 10 ng/ μL .

3.8. ISSRs e eletroforese em gel de agarose

Para a análise com marcadores moleculares, foi utilizado a técnica de ISSR. Foram usados 8 “primers” para cada género fúngico, através de reações de amplificação por PCR seguidas de eletroforese. A sequência dos nucleótidos dos “primers” estão apresentados na Tabela 1.

A escolha dos “primers” para cada género foi através de um teste de “primers” (Anexo II). Os “primers” UBC807, UBC810, UBC812, UBC864 e UBC880, foram utilizados nos três géneros fúngicos, UBC881 e UBC889, foram utilizados no género *Penicillium* e *Aspergillus*, UBC808, pelo género *Cladosporium* e *Penicillium*, UBC811 e UBC890 apenas foram utilizados pelo género *Cladosporium* e UBC835 pelo género *Aspergillus*.

Tabela 1. Sequência dos “primers” utilizados.

ISSR “primer”	Sequência (5’-3’)
UBC807	AG AGA GAG AGA GAG AGT
UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
UBC835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
UBC864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC880	GGA GAG GAG AGG AGA
UBC881	GGG TGG GGT GGG GTG
UBC889	DBD ACA CAC ACA CAC AC
UBC890	VHV GTG TGT GTG TGT GT

Para a reação de amplificação de ISSRs, foi feita uma Mix com os volumes indicados na Tabela 2, à exceção do DNA. Em cada tubo, foram adicionados 1 µL de DNA, e de seguida 24 µL da Mix, para cada amostra. Posteriormente, estas amostras foram colocadas no termociclador (T100™, BIO-RAD) durante cerca de três horas e trinta minutos, onde foram submetidas a diferentes ciclos de temperatura e tempo, que estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 2. Volume dos componentes utilizados na reação de ISSRs.

Componentes	Volume
H ₂ O	14,3 µL
Buffer 10x (Bioron®)	2,5 µL
Mgcl ₂ 25 mM	2,5 µL
dNTPs 2,5mM	2 µL
Primer 5µM	2 µL
DFS-Taq DNAPol. (Bioron®)	0,5 µL
BSA	0,2 µL
DNA	1 µL

Tabela 3. Condições para a reação de ISSRs.

	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	45
Hibridação	52°C	45 segundos	
Alongamento	72°C	2 minutos	
Alongamento final	72°C	10 minutos	1
	12°C	∞	

Depois da reação de amplificação, os produtos de PCR foram analisados num gel de agarose (1,8%) por eletroforese. Foram pesados 2,52 g de agarose em pó (SeaKem®) e adicionados 140 mL de TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA, Nzytech®), sendo esta dissolvida por aquecimento até à ebulição. De seguida, adicionou-se 4 µL de GreenSafe (Nzytech®) à solução anterior, e deixou-se arrefecer um pouco, sendo depois, depositada num suporte horizontal onde se colocou um pente, para a formação de poços para a deposição das amostras. Após polimerizar, o gel foi colocado numa tina de eletroforese e submerso em TAE. De seguida, adicionou-se 4 µL de solução de deposição ao produto de PCR. Nos poços das extremidades foram depositados 3 µL de marcador molecular (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific®) e nos restantes poços foram depositadas as amostras com a solução de deposição (Figura 10).

De seguida, o gel foi sujeito a uma eletroforese a 100V durante cerca de 3 horas. Para visualização do gel, efetuou-se a captação de imagem através do equipamento Molecular Imager Gel DocTM XR + With Image LabTM software da BioRad.

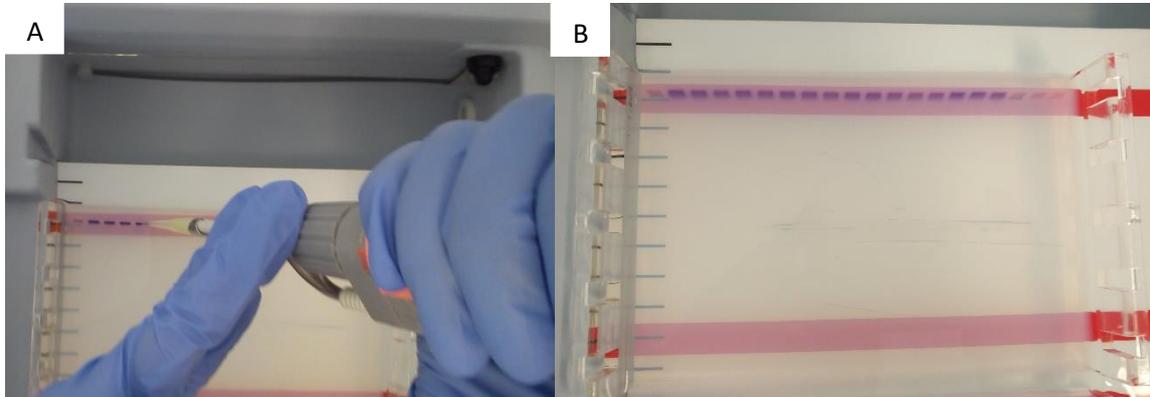


Figura 10. A- Colocação da amostra nos poços; **B-** Gel com as amostras e marcador (fotografias do autor).

3.9. Nested-PCR e eletroforese em gel de agarose

Para a espécie *Talaromyces marneffi* utilizou-se o método de nested-PCR, que consiste em duas reações com “primers” que amplificam sequências específicas. Na primeira reação utiliza-se os “primers” ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') e ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3'), estes amplificam um fragmento de 510-570 pb (Lu *et al.*, 2016). Para esta reação, foi feita uma Mix com os volumes indicados na Tabela 4, à exceção do DNA. Em cada tubo, foram adicionados 3 μ L de DNA, e de seguida 17 μ L da Mix, em cada amostra. Posteriormente, estas amostras foram colocadas no termociclador (T100TM, BIO-RAD) durante cerca de duas horas e trinta minutos, onde foram submetidas a diferentes ciclos de temperatura e tempo, que estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 4. Volume dos componentes utilizados para a primeira reação de Nested-PCR.

Componentes	Volume
Taq Master Mix (Bioron®)	10 µL
Primer RRF1 5µM	1 µL
Primer RRH1 5µM	1 µL
H ₂ O	5 µL
DNA	3 µL

Tabela 5. Condições para a primeira reação de Nested-PCR.

	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturação	95°C	30 segundos	35
Hibridação	55°C	30 segundos	
Alongamento	72°C	2 minutos	
Alongamento final	72°C	10 minutos	1
	12°C	∞	

Depois da reação de PCR, dos 20 µL do produto de reação foram guardados no congelador 5 µL, 14 µL foram utilizados para a eletroforese em gel e 1 µL guardado para a segunda reação. Para a eletroforese foi usado um gel de agarose a 1% e 3 µL de GreenSafe (Nzytech®), seguindo-se os mesmos passos que anteriormente. No primeiro e último poço foram depositados 3 µL de marcador molecular (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific®) e nos restantes 14 µL de DNA com 4 µL de solução de deposição. De seguida, o gel é sujeito a uma eletroforese a 100V durante cerca de uma hora. Para visualização do gel, efetuou-se a captação de imagem através do equipamento Molecular Imager Gel Doc™ XR + With Image Lab™ software da BioRad.

Na segunda reação, os “primers” utilizados foram o PM-F (5’GCTTGTGTGTTGGGTGTGGT3’) e PM-R (5’TTCCCGAGCGAGTGACAGA3’) e este vai amplificar um fragmento de 101 pb, na região ITS2 dos genes ITS rRNA de *T. marneffeii* (Lu *et al.*, 2016). Previamente, 1 µL de DNA guardado foi diluído numa proporção de 1: 1 000 (1 µL de DNA + 999 µL de água). Nesta reação, foi feita uma Mix com os volumes indicados na Tabela 6, à exceção do DNA. Em cada tubo, foram adicionados 1 µL de DNA, e de seguida 19 µL da Mix, em cada amostra. Posteriormente, estas amostras foram colocadas

no termociclador (T100TM, BIO-RAD) durante cerca de duas horas e trinta minutos, onde foram submetidas a diferentes ciclos de temperatura e tempo, que estão apresentados na tabela 7.

Tabela 6. Volume dos componentes utilizados para a segunda reação de Nested-PCR.

Componentes	Volume
Taq Master Mix (Bioron®)	10 µL
Primer Pw1 5µM	1 µL
Primer Pw2 5µM	1 µL
H ₂ O	7 µL
DNA (1:1 000)	1 µL

Tabela 7. Condições para a segunda reação de Nested-PCR.

	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturação	95°C	30 segundos	35
Hibridação	65°C	30 segundos	
Alongamento	72°C	2 minutos	
Alongamento final	72°C	10 minutos	1
	12°C	∞	

Depois da reação de PCR, são utilizados 5 µL do produto de reação para a eletroforese em gel e os restantes foram congelados. Para a eletroforese foi usado um gel de agarose a 1% e 3 µL de GreenSafe (Nzytech[®]), seguindo-se os mesmos passos que anteriormente. No primeiro e último poço foram depositados 3 µL de marcador molecular (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific[®]) e nos restantes 5 µL de DNA com 4 µL de solução de deposição. De seguida, o gel é sujeito a uma eletroforese a 100V durante cerca de uma hora. Para visualização do gel, efetuou-se a captação de imagem através do equipamento Molecular Imager Gel DocTM XR + With Image LabTM software da BioRad.

3.10. Sequenciação

Na espécie *Talaromyces marneffe* foi efetuada a sequenciação. Em primeiro, procedeu-se à purificação do produto de PCR do Nested-PCR utilizando o kit ExoSAP, foi feita uma mix que continha 2 µL de exonuclease, 7 µL de SAP e 6 µL de H₂O, e foram adicionados 3 µL da mix a 5 µL de produto de PCR para cada amostra. Posteriormente, estas amostras foram colocadas no termociclador (T100TM, BIO-RAD), a uma temperatura de 37°C durante 15 minutos, seguindo-se de 15 minutos a 85°C. Para obter a sequência do fragmento de interesse recorreu-se aos serviços Stabvida.

3.11. Análise de resultados

Os dados colhidos através do isolamento de fungos, foram processados nos programas informáticos SPSS® versão 22.0. A análise estatística para a componente fenotípica do estudo foi estritamente descritiva, recorrendo-se à análise univariada, tendo sido o tratamento da informação do tipo quantitativo. Efetuou-se a análise recorrendo a medidas de frequência absoluta e relativa. Para análise estatística da associação entre variáveis independentes e dependentes (objetivos do estudo atrás referidos) foi usado o teste de qui-quadrado (χ^2). Um nível de probabilidade (p) <0,05 foi considerado estatisticamente significativo na associação de variáveis.

Para os ISSRs, após a visualização de todos os géis de agarose, os fragmentos das reações de PCR foram analisados de acordo com a presença (1), ausência (0) ou dúvida entre presença/ausência (9) de bandas reprodutíveis em cada amostra e para cada um dos “primers” utilizados permitindo construir matrizes.

Para cada “primer” foi determinado o número total de bandas e o número de bandas polimórficas, e a partir destas foi calculada a percentagem de polimorfismo, usando a seguinte formula:

$$\% \text{ de polimorfismo} = (\text{n}^\circ \text{ de bandas polimórficas} / \text{n}^\circ \text{ total de bandas}) \times 100$$

O tratamento de dados com o software NTSYS, permitiu obter um dendrograma que possibilitou a análise filogenética das espécies em estudo. Para tal foi aplicado o coeficiente SM e o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean).

Em relação à sequenciação, os resultados enviados pela Stabvida foram tratados com os softwares Chromas Pro e Mega 7, para verificar o pictograma da sequência e obter a sequência em formato FASTA, e posteriormente, o programa Blast (NCBI) para a verificar a percentagem de identidade.

4. Resultados e Análise dos Resultados

4.1. Análise microbiológica

Foi efetuado um rastreio a 121 flores durante a época de Outono e Inverno 2017-2018. Quanto ao local de colheita, 60,3% (n=73) foram colhidas a Sul do rio Douro, no Concelho de Tarouca e 39,7% (n=48), a Norte do rio Douro no Concelho de Vila Real, ambos situados no Norte do país. As 10 espécies de flores em estudo encontram-se na Tabela 8. Estas flores encontravam-se distribuídas por 7 Ordens taxonómicas e por 9 Famílias.

As espécies mais representativas da amostra foram as Rosas (n=32; 26,4%), seguida das Camélias (n=25; 20,7%) e das Petúnias (n=22; 18,2%).

Tabela 8. Distribuição espécies de flores amostradas.

		Frequência	Percentagem
Azálea	<i>Rhododendron</i>	2	1,7
Bergénia	<i>Bergenia</i>	5	4,1
Camélia	<i>Camellia</i>	25	20,7
Crisântemo	<i>Chrysanthemum</i>	10	8,3
Dália	<i>Dahlia</i>	2	1,7
Jacinto	<i>Hyacinthoides</i>	2	1,7
Lychnis	<i>Lychnis</i>	11	9,1
Narciso	<i>Narcissus</i>	10	8,3
Petúnia	<i>Petunia</i>	22	18,2
Rosa	<i>Rosa</i>	32	26,4
	Total	121	100,0

De acordo com as Classes de flores em estudo, 9,9% (n=12) pertenciam a flores da Classe Liliatae e a grande maioria pertenciam à Classe Magnoliopsida (n=109; 90,1%).

Quanto à Ordem, a maioria pertencia à Ordem Rosales (n=32; 26,4%), seguida da Ordem Ericales (n=27; 22,3%) e Solanales (n=22; 18,2%) (Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição das flores amostradas pela respectiva Ordem.

	Frequência	Porcentagem
Asparagales	12	9,9
Asterales	12	9,9
Caryophyllales	11	9,1
Ericales	27	22,3
Rosales	32	26,4
Saxifragales	5	4,1
Solanales	22	18,2
Total	121	100,0

De acordo com as Famílias de flores em estudo, 26,4% (n=32) pertenciam a flores da Família Rosaceae, seguida da Família Theaceae (n=25; 20,7%) e da Família Solanaceae (n=22; 18,2%) (Tabela 10).

Tabela 10. Distribuição das flores amostradas pela respectiva Família.

	Frequência	Porcentagem
Amaryllidaceae	10	8,3
Asparagaceae	2	1,7
Asteraceae	12	9,9
Caryophyllaceae	11	9,1
Ericaceae	2	1,7
Rosaceae	32	26,4
Saxifragaceae	5	4,1
Solanaceae	22	18,2
Theaceae	25	20,7
Total	121	100,0

Relativamente à distribuição da colheita das amostras esta ocorreu entre setembro de 2017 e fevereiro de 2018. A maioria foi colhida no mês de outubro (n=48; 39,7%) e novembro (n=26; 21,5%) (Tabela 11). Quanto à época de colheita, a maioria das amostras foi colhida no Outono (n=79; 65,3%) e as restantes no Inverno (n=42; 34,7%).

Tabela 11. Distribuição das flores amostradas pelo mês de colheita.

	Frequência	Porcentagem
Fevereiro	13	10,7
Janeiro	17	14,0
Março	12	9,9
Novembro	26	21,5
Outubro	48	39,7
Setembro	5	4,1
Total	121	100,0

A ocorrência dos diferentes gêneros fúngicos isolados nas flores encontra-se sumariada na Tabela 12. Neste estudo identificaram-se 6 gêneros de fungos filamentosos: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Mucor* (Figura 11) e ainda a espécie *Talaromyces marneffei*. O gênero mais prevalente foi *Cladosporium* em que 99,2% das flores amostradas foram positivas para este gênero (Figura 12), seguido de *Penicillium* (60,3%) (Figura 13) e *Fusarium* (48,8%) (Figura 14). Em 62,8% das flores encontraram-se gêneros fúngicos que não foi possível identificar.

No total obtiveram-se neste estudo 838 isolados de fungos filamentosos. Dois isolados pertenciam à espécie de *Talaromyces marneffei*.

Em 43,0% das flores isolaram-se leveduras (Figura 14). Em 19,0% das flores isolou-se a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (Figura 14).

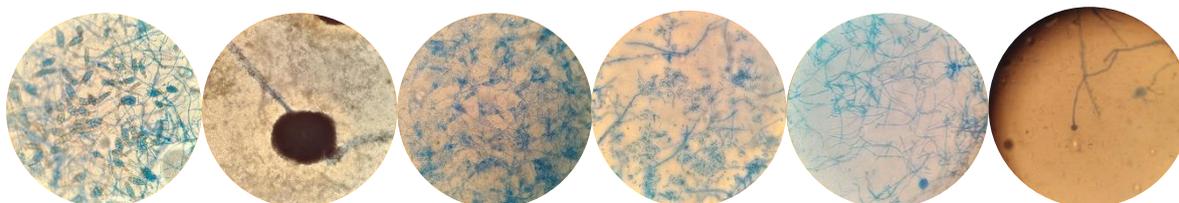


Figura 11. Características microscópicas dos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Mucor*, respectivamente.

Tabela 12. Ocorrência dos gêneros e espécies fúngicas isoladas nas 121 flores amostradas.

Gêneros fúngicos	N.º e % de flores em que foi isolado o gênero
<i>Alternaria</i>	38 (31,4%)
<i>Aspergillus</i>	8 (6,6%)
<i>Cladosporium</i>	120 (99,2%)
<i>Fusarium</i>	59 (48,8%)
<i>Mucor</i>	8 (6,6%)
<i>Penicillium</i>	73 (60,3%)
<i>Talaromyces marneffei</i>	2 (1,7%)
Fungos Filamentosos não identificados	76 (62,8%)
Leveduras	52 (43,0%)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	23 (19,0%)

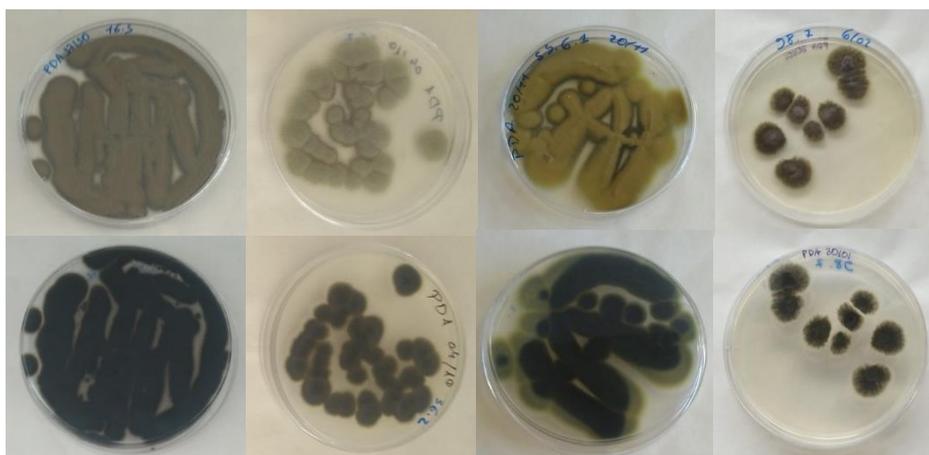


Figura 12. Características macroscópicas dos isolados do género *Cladosporium*.



Figura 13. Características macroscópicas dos isolados do género *Penicillium*.

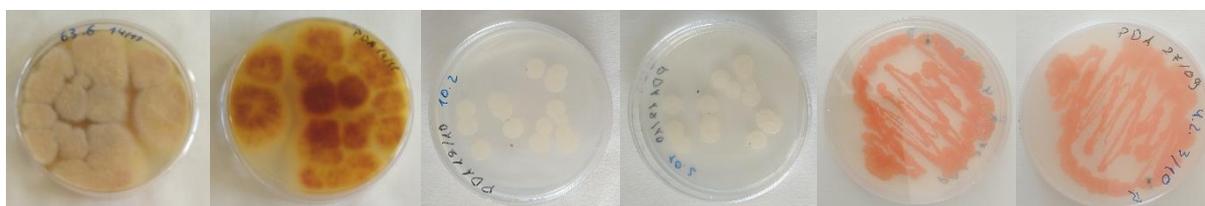


Figura 14. Características macroscópicas dos isolados do género *Fusarium*, Leveduras e a espécie *Rhodotorula mucilaginosa*, respetivamente.

4.1.1. Efeito da Espécie da flor no isolamento fúngico

Relativamente ao isolamento dos diferentes géneros de fungos filamentosos pelas espécies, em todas as flores amostradas foi isolado pelo menos um género fúngico. Nas azáleas apenas foi isolado o género *Cladosporium*. As rosas apresentaram o maior número de isolados e diversidade de géneros fúngicos. O isolamento dos géneros *Fusarium* ($p=0,000$) e *Penicillium* ($p=0,014$) foram significativamente mais elevados nas Camélias (Tabela 13).

Tabela 13. Distribuição da ocorrência dos diferentes géneros de fungos filamentosos pelas espécies da flor.

Espécie	<i>Alternaria</i> $p=0,227$	<i>Aspergillus</i> $p=0,306$	<i>Cladosporium</i> $p=0,827$	<i>Fusarium</i> $p=0,000$	<i>Mucor</i> $p=0,444$	<i>Penicillium</i> $p=0,014$
Azálea	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (1,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Bergénia	1 (2,6%)	0 (0,0%)	5 (4,2%)	1 (1,7%)	2 (25,0%)	5 (6,8%)
Camélia	7 (18,4%)	0 (0,0%)	25 (20,8%)	21 (35,6%)	1 (12,5%)	17 (23,3%)
Crisântemo	1 (2,6%)	0 (0,0%)	9 (7,5%)	7 (11,9%)	1 (12,5%)	5 (6,8%)
Dália	1 (2,6%)	0 (0,0%)	2 (1,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,4%)
Jacinto	1 (2,6%)	0 (0,0%)	2 (1,7%)	1 (1,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Lychnis	6 (15,8%)	1 (12,5%)	11 (9,2%)	8 (13,6%)	0 (0,0%)	9 (12,3%)
Narciso	6 (15,8%)	0 (0,0%)	10 (8,3%)	2 (3,4%)	0 (0,0%)	2 (2,7%)
Petúnia	7 (18,4%)	3 (37,5%)	22 (18,3%)	7 (11,9%)	2 (25,0%)	12 (16,4%)
Rosa	8 (21,1%)	4 (50,0%)	32 (26,7%)	12 (20,3%)	2 (25,0%)	22 (30,1%)

4.1.2. Efeito da Classe da flor no isolamento fúngico

A distribuição dos géneros isolados pelas classes das flores encontra-se na Tabela 14. Conforme se pode visualizar pela análise da tabela, a Classe Magnoliopsida apresentou a maior ocorrência de isolamento de géneros fúngicos. As diferenças foram significativas para os géneros *Alternaria* (Figura 15) ($p=0,042$) e *Penicillium* ($p=0,001$).

Os géneros *Aspergillus* (Figura 16) e *Mucor* (Figura 17) apenas foram isolados na Classe Magnoliopsida, mas as diferenças não foram significativas.

Tabela 14. Distribuição da ocorrência dos diferentes gêneros de fungos filamentosos pelas Classes Taxonômicas da flor.

Classe	<i>Alternaria</i> <i>p=0,042</i>	<i>Aspergillus</i> <i>p=0,188</i>	<i>Cladosporium</i> <i>p=0,647</i>	<i>Fusarium</i> <i>p=0,076</i>	<i>Mucor</i> <i>p=0,331</i>	<i>Penicillium</i> <i>p=0,001</i>
Liliatae	7 (18,4%)	0 (0,0%)	12 (10,0%)	3 (5,1%)	0 (0,0)	2 (2,7%)
Magnoliopsida	31 (81,6%)	8 (100%)	108 (90,0%)	56 (94,9%)	8 (100%)	71 (97,3%)

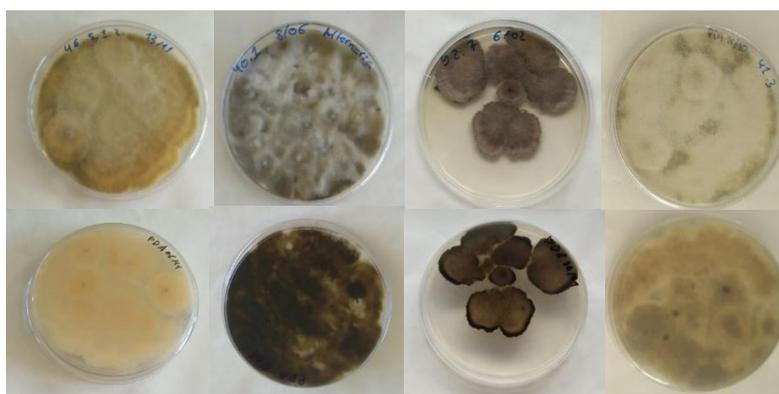


Figura 15. Características macroscópicas dos isolados do gênero *Alternaria*.



Figura 16. Características macroscópicas dos isolados do gênero *Aspergillus*.

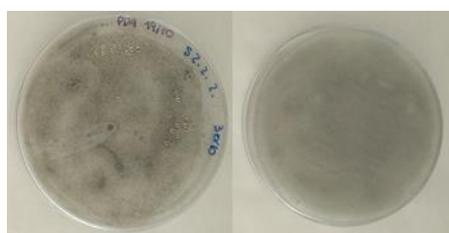


Figura 17. Características macroscópicas do gênero *Mucor*.

4.1.3. Efeito da Ordem da flor no isolamento fúngico

A distribuição dos gêneros isolados pelas Ordens das flores encontra-se na Tabela 15. O isolamento do gênero *Fusarium* foi significativamente mais elevado na Ordem Ericales ($p=0,001$). Em todas as ordens amostradas ocorreu o isolamento de algum gênero fúngico.

Tabela 15. Distribuição da ocorrência dos diferentes gêneros de fungos filamentosos pelas Ordens Taxonômicas da flor.

Ordem	<i>Alternaria</i> $p=0,179$	<i>Aspergillus</i> $p=0,102$	<i>Cladosporium</i> $p=0,583$	<i>Fusarium</i> $p=0,001$	<i>Mucor</i> $p=0,211$	<i>Penicillium</i> $p=0,004$
Asparagales	7 (18,4%)	0 (0,0%)	12 (10,0%)	3 (5,1%)	0 (0,0%)	2 (2,7%)
Asterales	2 (5,3%)	0 (0,0%)	11 (9,2%)	7 (11,9%)	1 (12,5%)	6 (8,2%)
Caryophyllales	6 (15,8%)	1 (12,5%)	11 (9,2%)	8 (13,6%)	0 (0,0%)	9 (12,3%)
Ericales	7 (18,4%)	0 (0,0%)	27 (22,5%)	21 (35,6%)	1 (12,5%)	17 (23,3%)
Rosales	8 (21,1%)	4 (50,0%)	32 (26,7%)	12 (20,3%)	2 (25,0%)	22 (30,1%)
Saxifragales	1 (2,6%)	3 (0,0%)	5 (4,2%)	1 (1,7%)	2 (25,0%)	5 (6,8%)
Solanales	7 (18,4%)	8 (37,5%)	22 (18,3%)	7 (11,9%)	2 (25,0%)	12 (16,4%)

4.1.4. Efeito da Família da flor no isolamento fúngico

A distribuição dos gêneros isolados pelas Famílias das flores encontra-se na Tabela 16. O isolamento do gênero *Fusarium* foi significativamente mais elevado na Família Theaceae ($p=0,001$). Em todas as famílias amostradas ocorreu o isolamento de algum gênero fúngico.

Tabela 16. Distribuição da ocorrência dos diferentes géneros de fungos filamentosos pelas Famílias Taxonómicas da flor.

Famílias	<i>Alternaria</i> <i>p=0,249</i>	<i>Aspergillus</i> <i>p=0,227</i>	<i>Cladosporium</i> <i>p=0,789</i>	<i>Fusarium</i> <i>p=0,000</i>	<i>Mucor</i> <i>p=0,282</i>	<i>Penicillium</i> <i>p=0,002</i>
Amaryllidaceae	6 (15,8%)	0 (0,0%)	10 (8,3%)	2 (3,4%)	0 (0,0%)	2 (2,7%)
Asparagaceae	1 (2,6%)	0 (0,0%)	2 (1,7%)	1 (1,7%)	2 (3,8%)	0 (0,0%)
Asteraceae	2 (5,3%)	0 (0,0%)	11 (9,2%)	7 (11,9%)	1 (12,5%)	6 (8,2%)
Caryophyllaceae	6 (15,8%)	1 (12,5%)	11 (9,2%)	8 (13,6%)	0 (0,0%)	9 (12,3%)
Ericaceae	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (1,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Rosaceae	8 (21,1%)	4 (50,0%)	32 (26,7%)	12 (20,3%)	2 (25,0%)	22 (30,1%)
Saxifragaceae	1 (2,6%)	0 (0,0%)	5 (4,2%)	1 (1,7%)	2 (25,0%)	5 (6,8%)
Solanaceae	7 (18,4%)	3 (37,5%)	22 (18,3%)	7 (11,9%)	2 (25,0%)	12 (16,4%)
Theaceae	7 (18,4%)	0 (0,0%)	25 (20,8%)	21 (35,6%)	1 (12,5%)	17 (23,3%)

4.1.5. Efeito da Época da colheita da amostra no isolamento fúngico

Relativamente à época do ano, o isolamento de géneros fúngicos foi sempre superior no Outono do que no Inverno. Contudo, esta diferença apenas foi significativa para o género *Aspergillus* ($p=0,008$) (Tabela 16).

Tabela 17. Distribuição da ocorrência dos diferentes géneros e espécies de fungos filamentosos pela época da colheita da amostra.

Época	<i>Alternaria</i> <i>p=0,590</i>	<i>Aspergillus</i> <i>p=0,008</i>	<i>Cladosporium</i> <i>p=0,355</i>	<i>Fusarium</i> <i>p=0,084</i>	<i>Mucor</i> <i>p=0,865</i>	<i>Penicillium</i> <i>p=0,602</i>
Outono	23 (60,5%)	8 (100,0%)	78 (65,0%)	34 (57,6%)	5 (62,5%)	49 (67,1%)
Inverno	15 (39,5%)	0 (0,0%)	42 (35,0%)	25 (42,4%)	3 (37,5%)	24 (32,9%)

4.1.6. Efeito do Local de Colheita

Relativamente ao local da colheita, o isolamento de *Aspergillus* ($p=0,004$) foi significativamente superior no concelho de Vila Real, enquanto que o isolamento de *Fusarium* foi significativamente superior no concelho de Tarouca ($p=0,000$) (Tabela 17).

Tabela 18. Distribuição da ocorrência dos diferentes géneros e espécies de fungos filamentosos pela época da colheita da amostra.

Local Colheita	<i>Alternaria</i> $p=0,404$	<i>Aspergillus</i> $p=0,004$	<i>Cladosporium</i> $p=0,172$	<i>Fusarium</i> $p=0,000$	<i>Mucor</i> $p=0,178$	<i>Penicillium</i> $p=0,987$
Tarouca	25 (65,8%)	1 (12,5%)	73 (60,8%)	46 (78,0%)	3 (37,5%)	44 (60,3%)
Vila Real	13 (34,2%)	7 (87,5%)	47 (39,2%)	13 (22,0%)	5 (62,5%)	29 (39,7%)

4.1.7. Isolamento e Identificação de *Talaromyces marneffe*

Os dois isolados de *Talaromyces marneffe* (Figura 18) distribuíram-se pelas 2 classes em estudo, um isolado ocorreu na ordem Asparagales e Família Asparagaceae e outro na Ordem Solanales e na Família Solanaceae. Um dos isolados fúngicos ocorreu no género *Hyacinthoides* e à espécie floral Jacinto, o outro isolado ocorreu no género *Petunia* e na espécie Petúnia. Quanto à época do ano, distribuíram-se por ambas as épocas e por ambos os locais de estudo.

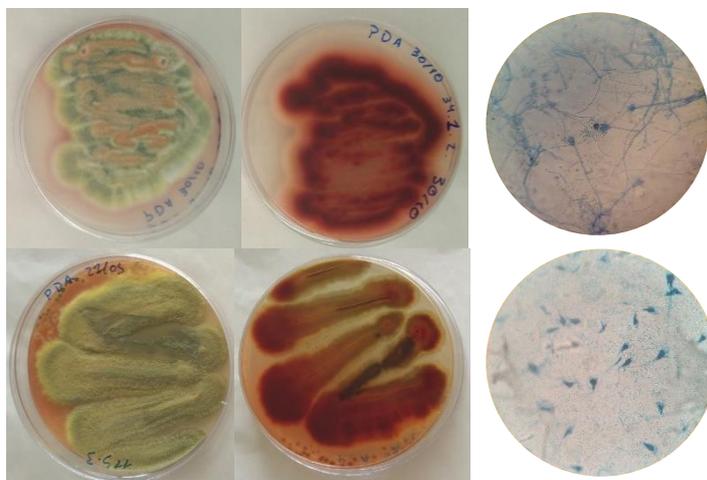


Figura 18. Os dois isolados de *Talaromyces marneffe*, características macroscópicas e microscópicas.

4.2. Análise molecular

4.2.1 ISSRs do género *Cladosporium*

Para a amplificação do DNA através de ISSRs em amostras do género *Cladosporium*, foram utilizados os seguintes “primers”: UBC807, UBC808, UBC810, UBC811, UBC812, UBC864, UBC880 e UBC890. Na Figura 19 está um exemplo de um gel com a amplificação com o “primer” UBC811.

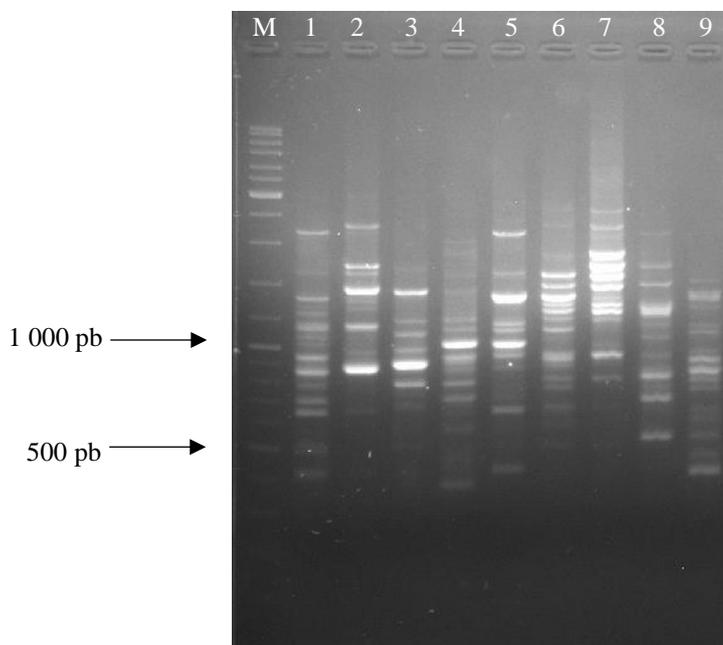


Figura 19. Fragmentos de DNA amplificados nas 9 amostras do género *Cladosporium* com o “primer” UBC811. Legenda: M- Marcador molecular; 1- 14.4; 2- 21.3; 3- 30.2; 4- 36.2; 5- 38.1; 6- 39.1; 7- 42.1; 8- 47.2; 9- 50.2

Analisando a Tabela 19, correspondente as amostras do género *Cladosporium*, no conjunto de todos os “primers” foram observadas 310 bandas, das quais 305 eram bandas polimórficas. No “primer” UBC808, obtiveram-se o maior número de bandas, com 45 bandas e no “primer” UBC812 foi onde ocorreu o menor número de bandas, com 29 bandas, numa média de 38,8 bandas por “primer”.

Em relação às bandas polimórficas, o maior número foi observado com o “primer” UBC808, com 45 bandas e o menor número no “primer” UBC812, com 28 bandas, numa média de 38,1 bandas polimórficas por “primer”. A taxa de polimorfismo foi máxima para os “primers” UBC808, UBC810, UBC811, UBC864, UBC880 e UBC890, e menor para o “primer” UBC807 com 97,1% e para o “primer” UBC812, com 96,6%. Em média, a taxa de polimorfismo foi de 99,2% (Tabela 19).

No que diz respeito as bandas únicas obtiveram-se 64 bandas únicas, sendo que ao “primer” UBC808 correspondeu o maior número de bandas, com 15 bandas e o menor número de bandas únicas ao “primer” UBC880, com 3, obtendo-se uma média de 8 bandas únicas por “primer” (Tabela 19).

O tamanho do fragmento variou entre os 300 e 2500 pb, sendo que o “primer” UBC890 teve a maior variação de amplificação (300-2500 pb) e o “primer” UBC864 teve a menor variação de amplificação (350-2000 pb) (Tabela 19).

Tabela 19. Resultados da amplificação e percentagem de polimorfismo de cada “primer” de ISSR para o género *Cladosporium*.

"Primer"	Nº de bandas	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas únicas	% de polimorfismo	Varição da amplificação (pb)
UBC807	34	33	7	97,1%	380-2050
UBC808	45	45	15	100%	300-2350
UBC810	38	38	8	100%	320-2500
UBC811	43	43	10	100%	400-2300
UBC812	29	28	7	96,6%	300-2050
UBC864	39	39	6	100%	350-2000
UBC880	39	39	3	100%	400-2500
UBC890	43	40	8	100%	300-2500
Total	310	305	64	99,2%	300-2500

4.2.2. ISSRs do género *Aspergillus*

Para a amplificação do DNA através de ISSRs em amostras do género *Aspergillus*, foram utilizados os seguintes “primers”: UBC807, UBC810, UBC812, UBC835, UBC864, UBC880, UBC881 e UBC890. Na Figura 20 está um exemplo da amplificação de um gel com o “primer” UBC889.

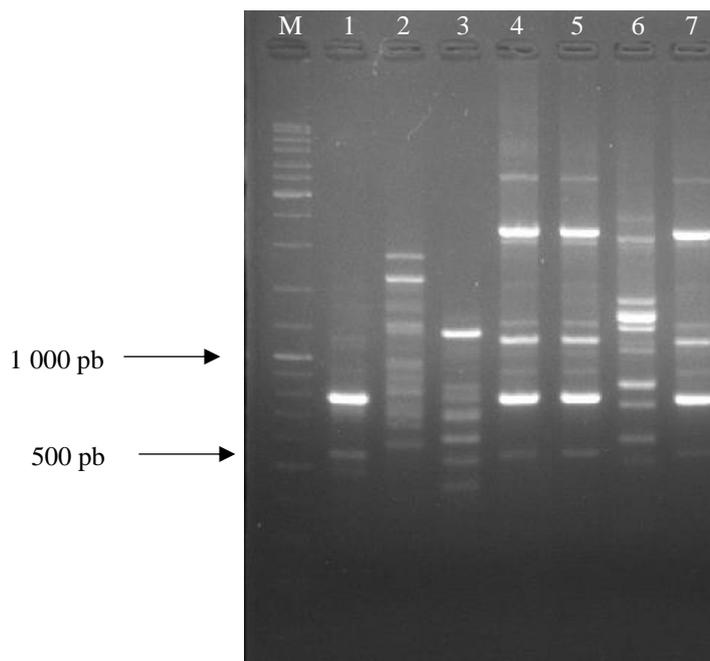


Figura 20. Fragmentos de DNA amplificados nas 7 amostras do género *Aspergillus* com o “primer” UBC889. Legenda: M- Marcador molecular; 1- 36.4; 2- 43.5; 3- 47.3; 4- 52.4; 5- 54.6; 6- 58.5; 7- 66.4.

Analisando a Tabela 20, correspondente às amostras do género *Aspergillus*, no conjunto de todos os “primers” foram observadas 224 bandas, das quais 218 eram bandas polimórficas. No “primer” UBC889, obtiveram-se o maior número de bandas, com 35 bandas e no “primer” UBC810 foi onde ocorreu o menor número de bandas, com 17 bandas, numa média de 28 bandas por “primer”.

Em relação às bandas polimórficas, o maior número foi observado com o “primer” UBC889, com 35 bandas e o menor número com o “primer” UBC807, com 14 bandas, numa média de 27,3 bandas polimórficas por “primer”. A taxa de polimorfismo foi máxima para os “primers” UBC810, UBC812, UBC864, UBC880 e UBC889, e a menor para o “primer” UBC807 com 77,8%. Em média, a taxa de polimorfismo foi de 96,4% (Tabela 20).

Relativamente às bandas únicas obtiveram-se 74 bandas únicas, sendo que ao “primer” UBC889 correspondeu o maior número de bandas únicas, com 16 bandas e o menor número de bandas únicas ao “primer” UBC810, com 3, obtendo-se uma média de 9,3 bandas únicas por “primer” (Tabela 20).

O tamanho dos fragmentos variou entre os 300 e 2500 pb, sendo que o “primer” UBC812 teve a maior variação de amplificação (300-2500 pb) e o “primer” UBC807 teve a menor variação de amplificação (320-1500 pb) (Tabela 20).

Tabela 20. Resultados da amplificação e percentagem de polimorfismo de cada “primer” de ISSR para o género *Aspergillus*.

"Primer"	Nº de bandas	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas únicas	% de polimorfismo	Varição da amplificação (pb)
UBC807	18	14	6	77,8%	320-1500
UBC810	17	17	3	100%	300-1900
UBC812	32	32	12	100%	300-2500
UBC835	30	29	7	96,7%	400-2300
UBC864	25	25	12	100%	420-2000
UBC880	34	34	9	100%	380-2200
UBC881	33	32	9	97%	380-2400
UBC889	35	35	16	100%	450-2500
Total	224	218	74	96,4%	300-2500

4.2.3. ISSRs do género *Penicillium* e da espécie *Talaromyces marneffi*

Para a amplificação do DNA através de ISSRs em amostras do género *Penicillium* e da espécie *Talaromyces marneffi*, foram utilizados os seguintes “primers”: UBC807, UBC808, UBC810, UBC812, UBC864, UBC880, UBC881 e UBC889. Na Figura 21 está um exemplo da amplificação de um gel com o “primer” UBC808.

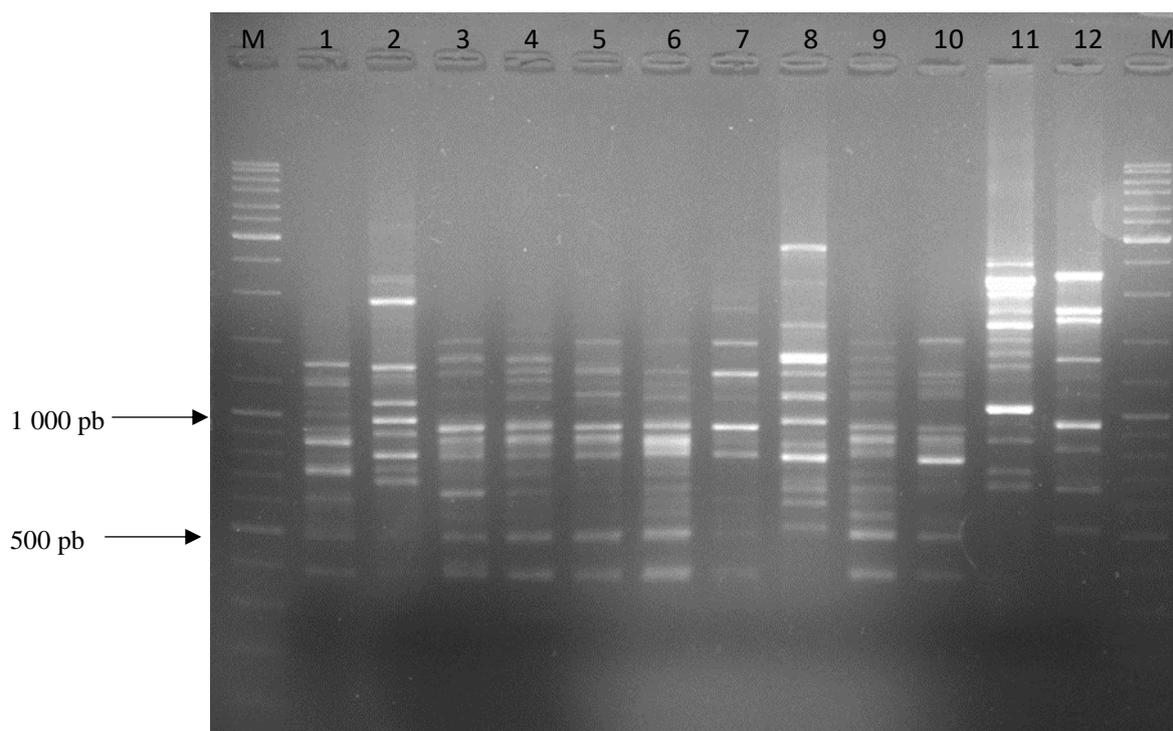


Figura 21. Fragmentos de DNA amplificados nas 10 amostras do género *Penicillium* e nas 2 amostras da espécie *Talaromyces marneffeii* com o “primer” UBC808. Legenda: M- Marcador molecular; 1- 22.5; 2- 24.2; 3- 25.2; 4- 26.3; 5- 41.5; 6- 45.3; 7- 55.2; 8- 57.3; 9- 97.

Analisando a Tabela 21, correspondente as amostras do género *Penicillium* e da espécie *Talaromyces marneffeii*, no conjunto de todos os “primers” foram observadas 231 bandas, das quais 218 eram bandas polimórficas. No “primer” UBC889, obtiveram-se o maior número de bandas, com 39 bandas e no “primer” UBC807 foi onde ocorreu o menor número de bandas, com 17 bandas, numa média de 28,9 bandas por “primer”.

Em relação às bandas polimórficas, o maior número foi observado com o “primer” UBC889, com 39 bandas e o menor número com o “primer” UBC807, com 12 bandas, numa média de 27,3 bandas polimórficas por “primer”. A taxa de polimorfismo foi máxima para os “primers” UBC808, UBC880, UBC881 e UBC889, e menor para o “primer” UBC807 com 77,8%. Em média, a taxa de polimorfismo foi de 92,6% (Tabela 21).

Já no que diz respeito as bandas únicas, obtiveram-se 46 bandas únicas, sendo que o “primer” UBC812 correspondeu ao maior número de bandas, com 11 bandas e com menor número de bandas únicas para os “primers” UBC881 e UBC889, com 1, obtendo-se uma média de 5,8 bandas únicas por “primer” (Tabela 21).

A variação do fragmento variou entre os 350 e 2500 pb, sendo que os “primers” UBC881 e UBC889, tiveram a maior variação de amplificação (350-2500 pb) e o “primer” UBC807 teve a menor variação de amplificação (380-1550 pb) (Tabela 21).

Tabela 21. Resultados da amplificação e percentagem de polimorfismo de cada “primer” de ISSR para o género *Penicillium* e espécie *Talaromyces marneffe*.

"Primer"	Nº de bandas	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas únicas	% de polimorfismo	Variação da amplificação (pb)
UBC807	17	12	4	70,6%	380-1550
UBC808	32	32	8	100%	400-2250
UBC810	28	27	8	96,4%	380-2400
UBC812	26	22	11	84,6%	450-2450
UBC864	27	24	7	88,9%	400-2400
UBC880	27	27	6	100%	350-2200
UBC881	35	35	1	100%	350-2500
UBC889	39	39	1	100%	350-2500
Total	231	218	46	92,6%	350-2500

4.2.4. Análise filogenética a partir dos ISSRs

A análise filogenética realizou-se com base nos resultados obtidos com a análise dos ISSRs, construindo dendrogramas a partir das matrizes obtidas.

Ao analisar o dendrograma da Figura 22, correspondente ao género *Cladosporium*, verifica-se a formação de três grupos distintos, visualizando que o grupo III apresenta a menor relação filogenética com os restantes ($\approx 0,56$). O grupo II tem uma similaridade de, aproximadamente, 0,564 com o grupo I.

O maior valor de similaridade verificado com as amostras, foi de, aproximadamente, 0,682, entre as amostras 39.1 e 42.1 (Figura 22).

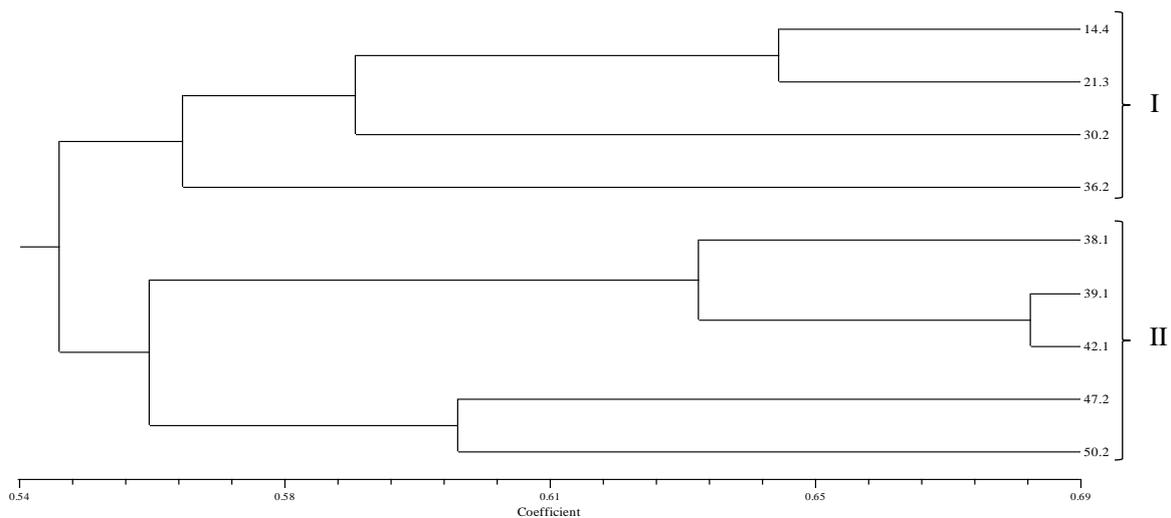


Figura 22. Dendrograma com as relações filogenéticas entre as 9 amostras do género *Cladosporium* com base nos ISSRs.

Ao analisar o dendrograma da Figura 23, correspondente ao género *Aspergillus*, verifica-se a formação de três grupos distintos, visualizando que o grupo III apresenta a menor relação filogenética com os restantes ($\approx 0,477$). O grupo II tem uma similaridade de, aproximadamente, 0,544 com o grupo I.

O maior valor de similaridade verificado entre duas amostras, foi de, aproximadamente, 0,725 entre as amostras 52.4 e 66.4 (Figura 23).

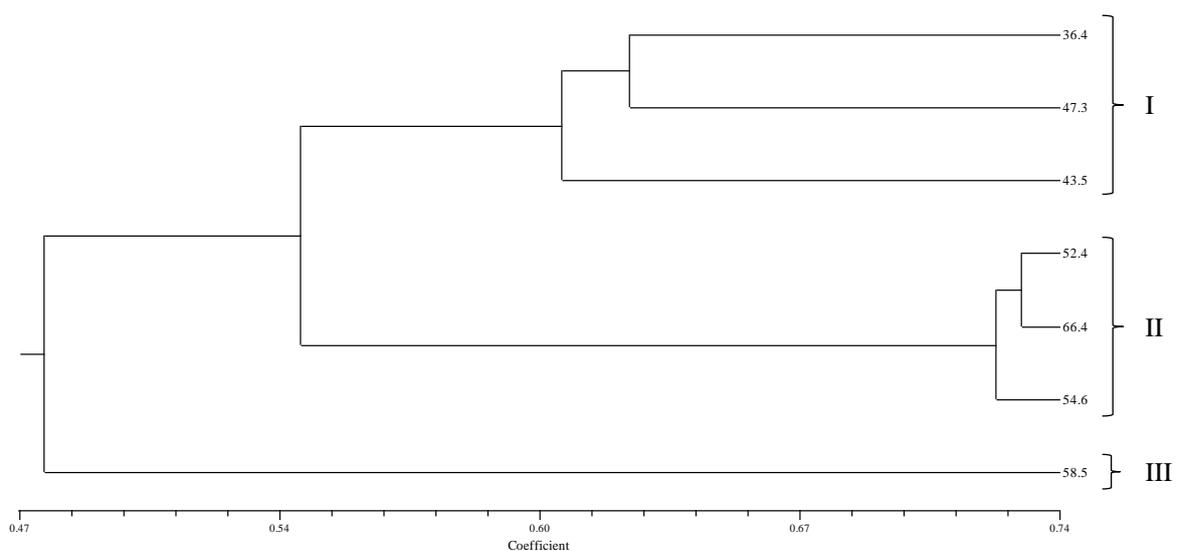


Figura 23. Dendrograma com as relações filogenéticas entre as 7 amostras do género *Aspergillus* com base nos ISSRs.

Ao analisar o dendrograma da Figura 24, correspondente ao género *Penicillium* e a espécie *Talaromyces marneffe*, verifica-se a formação de quatro grupos distintos, visualizando que o grupo IV apresenta a menor relação filogenética com os restantes (0,584), que corresponde às duas amostras de *Talaromyces marneffe*. Os restantes grupos pertencem a amostras do género *Penicillium*, onde o grupo I tem uma similaridade de, aproximadamente, 0,63 com os restantes grupos. O grupo II tem uma similaridade de, aproximadamente, 0,635 com o grupo III.

O maior valor de similaridade verificado entre duas amostras, foi de, aproximadamente, 0.82, entre as amostras 41.5 e 45.3 (Figura 24).

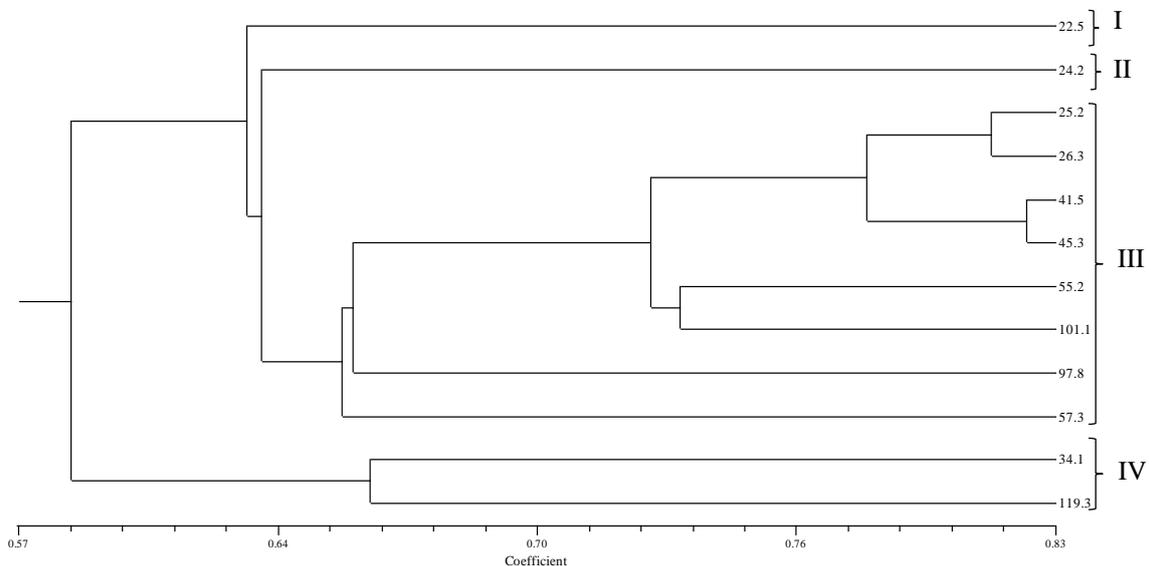


Figura 24. Dendrograma com as relações filogenéticas entre as 10 amostras do género *Penicillium* e a espécie *Talaromyces marneffe* com base nos ISSRs.

4.2.5. Reação Nested-PCR

Nested-PCR baseia-se em duas reações de “primers” que amplificam sequências específicas. A primeira reação é realizada com “primers” específicos para fungos (ITS4 e ITS5), resultando numa banda de aproximadamente 510-570 pb.

Pela visualização do gel da Figura 25 A verifica-se que, a amostra número 1 amplificou na região entre os 500-600 pb e a amostra número 2 não amplificou.

A segunda reação é realizada com “primers” específicos para a espécie *Talaromyces marneffe* (PM-F e PM-R), resultando numa banda de aproximadamente 101 pb.

Pela visualização do gel da Figura 25 B verifica-se que, ambas as amostras amplificaram na região dos 101 pb.

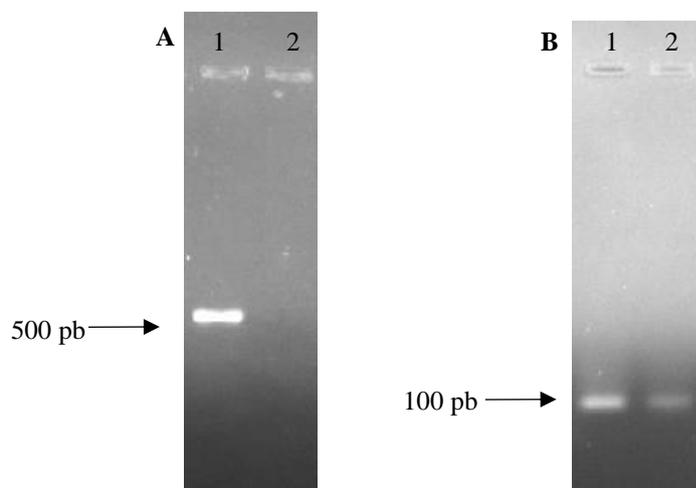


Figura 25. A- Gel da 1ª Reação de Nested-PCR. B- Gel da 2ª Reação de Nested-PCR. Legenda: 1- Amostra 34.1.2; 2- Amostra 119.3.

4.2.6. Sequenciação de *Talaromyces marneffe*

A análise das sequências obtidas foi feita através de ferramentas bioinformáticas e à realização de um BLAST recorrendo à base de dados do NCBI de modo a verificar a identidade da nossa sequência e na sequência Reverse do genoma de *Talaromyces marneffe*.

A Sequência obtida para a amostra 34.1, foi:

```
CGAGCAGCGGCGACGTCCGTCTGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACTCGCT  
CGGGAAAC,
```

e a Sequência Reverse, foi:

```
TGCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCGGGGACCTGCCCGAAAGGCAGCGGCGAC  
GTCCGTCTC.
```

A identidade da sequência, foi máxima, ou seja 100% (Figura 26), e igualmente, a identidade da sequência Reverse foi de 100% (figura 27).

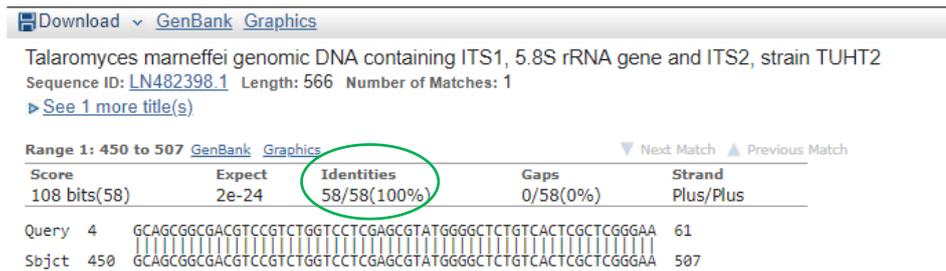


Figura 26. BLAST da Sequência relativamente ao genoma da amostra 34.1 e percentagem de identidade.

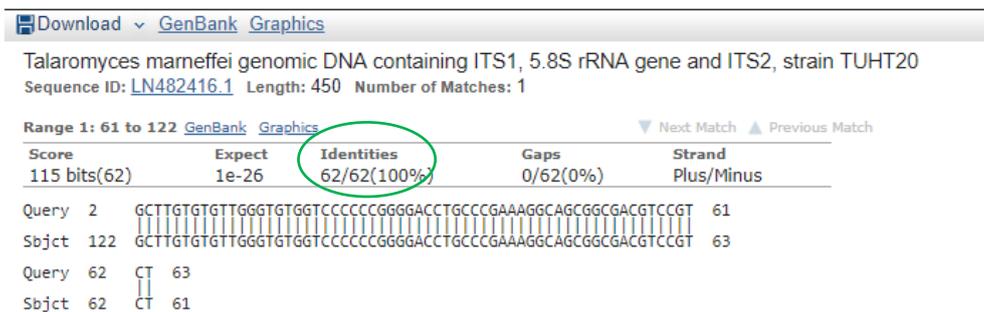


Figura 27. BLAST da Sequência Reverse relativamente ao genoma da amostra 34.1 e percentagem de identidade.

Para a amostra 119.3, a Sequência obtida, foi:

GCTGCGAGAGCGGGCGACGTCCGTCTGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACTC
GCTCGGGAAA,

e a sequência reversa, foi:

TTGCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCGGGGACCTGCCCGAAAGGCAGCGGCGA
CGTCCTTCTT.

A identidade da sequência, foi de 98% (Figura 28), e igualmente, a identidade da sequência Reverse foi de 98% (figura 29).

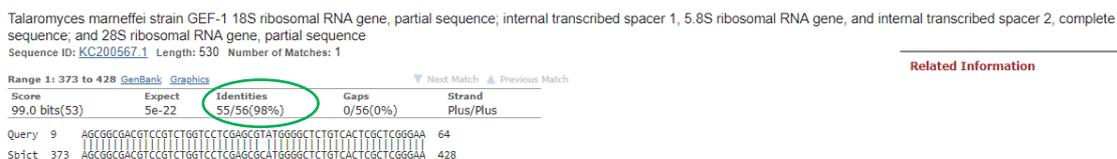


Figura 28. BLAST da Sequência relativamente ao genoma da amostra 119.3 e percentagem de identidade.

Talaromyces marneffei strain GEF-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [KC200567.1](#) Length: 530 Number of Matches: 1

Range 1: 328 to 389 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
110 bits(59)	6e-25	61/62(98%)	0/62(0%)	Plus/Plus

Query 3 GCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCGGGGACCTGCCCCGAAAGGCAGCGGCGACGTCCCTT 62
Sbjct 328 GCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCGGGGACCTGCCCCGAAAGGCAGCGGCGACGTCCGT 387

Query 63 CT 64
Sbjct 388 CT 389

[Related Information](#)

Figura 29. BLAST da Sequência Reverse relativamente ao genoma da amostra 119.3 e percentagem de identidade.

5. Discussão

Neste estudo foi efetuado o isolamento de fungos em flores, uma vez que as flores são habitualmente uma fonte de fragância, e o ser humano tem o hábito de cheirar as flores, como é o exemplo das rosas, sendo também uma espécie muito oferecida. O ato de cheirar uma flor pode constituir um risco se um fungo com capacidade infetante estiver presente. Neste trabalho a rosa foi a amostra mais representativa. De acordo com a pesquisa biobibliográfica realizada, os estudos de fungos em plantas são normalmente realizados no interior da planta, mesmo em estudos em flores, são realizados numa porção da pétala que é lavada e esterilizada para eliminar qualquer vestígio externo (Manganyi *et al.*, 2018; Supaphon, *et al.*, 2018). Sendo assim, a pesquisa foi direcionada para estudos que podem influenciar a presença de fungos nas flores, como os fungos presentes nas plantas, no ar envolvente e no solo e também foi realizada uma pesquisa bibliográfica sobre estudos realizados em cavidades nasais de humanos e assim verificar se existe similaridades.

Os fungos filamentosos e as leveduras são frequentemente encontrados em qualquer matéria orgânica, sendo espécies bem-sucedidos é de esperar que sejam encontradas em vários tipos de habitats (Bandh *et al.*, 2016). No nosso estudo, em 43% das flores isolaram-se leveduras e foram identificados 6 géneros de fungos filamentosos, sendo o *Cladosporium* (99,2%) o mais isolado, seguido de *Penicillium* (60,3%), *Fusarium* (48,8%), *Alternaria* (31,4%), *Aspergillus* (6,6%) e *Mucor* (6,6%). No entanto, em 62,8 % das flores encontraram-se géneros fúngicos que não foi possível identificar.

Num estudo de isolados do ar de diferentes ambientes efetuado por Fatahinia *et al.* (2018), o género *Cladosporium* também foi o mais isolado (37,1%), seguido de *Alternaria* (25,7%), *Aspergillus* (13,5%), *Penicillium* (5,9%), *Drechslera* e *Stemphylium*, sendo que neste *Penicillium* tem uma menor frequência. Noutro estudo semelhante realizado por Ghiasian *et al.* (2016), *Cladosporium* também foi o género prevalente (30,9%), seguidos por *Penicillium* (27,3%), *Aspergillus* (24,5%) e *Alternaria* (3,3%), sendo que neste, *Penicillium* teve uma maior prevalência em comparação ao anterior. Similarmente, Arikoglu *et al.* (2016) realizaram um estudo em ambiente exterior, em que também se obteve o género *Cladosporium* (76,8%) como o mais prevalente, seguido por *Penicillium* (10,7%), *Aspergillus* (5,8%) e *Alternaria* (3,9%). Contrariamente, num estudo de um ambiente externo (Ziaee *et al.*, 2018) os géneros predominantes foram, *Aspergillus* (22,10%), *Alternaria* (18,95%) e

Cladosporium (14,74%) sendo que neste *Cladosporium* já não foi o género dominante, indo de acordo com os resultados do nosso estudo também num estudo de isolados do ar (Shams-Ghahfarokhi et., 2014) *Aspergillus* também foi o mais prevalente (31,3%), seguido de *Cladosporium* (22,1%), *Penicillium* (13,8%) e *Alternaria* (12,2%).

Em amostras de solo da província de Al-Qassim, KSA, foram isoladas por Al-Enazi *et al.* (2018), 21 espécies de fungos, sendo estas, *Penicillium melinii*, *Petriella setifera*, *Aspergillus pseudo-niger*, *Alternaria chlamydospora*, *Pythium nayoroense*, *Phoma glomerata*, *Mucor ramosis-simus*, *Mucor racemosus*, *Fusarium chlamydosporum* e *Rhizopusazygosporus*, estando presente 5 géneros dos 6 isolados no nosso estudo. Num estudo realizado por Pal e Ghosh (2014), em amostras de solos agrícolas e de jardins, foram isolados 31 fungos, 19 pertenciam ao solo agrícola e 28 ao solo de jardim, o solo de jardim apresentou mais colónias fúngicas (750) do que o solo agrícola (477) e o solo de jardim apresentaram uma maior diversidade. No solo agrícola, os fungos dominantes foram *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* e *Penicillium expansum* e os fungos dominantes do solo do jardim foram *Aspergillus niger* e *Fusarium moniliforme*. Em concordância, um estudo realizado por Oliveira *et al.* (2013), os géneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram os mais ocorrentes. No mesmo estudo também se verificou que não houve diferença na prevalência dos isolados entre as estações chuvosas ou secas ou entre as amostras de superfície ou abaixo dos solos. Também no estudo em solos de Jena *et al.* (2015), *Aspergillus* foi o género mais prevalente, seguido de *Penicillium*. Também de acordo, está o estudo de Lin *et al.* (2016), os géneros dominantes foram *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma*, contudo, o género *Aspergillus* não foi um isolado prevalente.

Os esporos de fungos são ubíquos, sendo frequente a sua inalação e retenção na mucosa nasal (Twarużek *et al.*, 2014). Nas cavidades nasais de morcegos, foram isolados os géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* (Shapiro *et al.*, 2015) e em Mico-leão-preto (Carvalho *et al.*, 2014), onde foram colhidas amostras de animais em liberdade e em cativeiro, nos animais em liberdade os géneros prevalentes foram *Aspergillus*, *Penicillium* e *Paecilomyces* e em cativeiro foram *Penicillium* e *Trichoderm*, foi observado um maior número de fungos isolados e de géneros nos animais em liberdade e ainda foram isoladas leveduras do género *Candida* em 37,5% dos isolados. Num estudo sobre a microbiota fúngica nasal (Sellart-Altisent *et al.*, 2007), em pacientes saudáveis e pacientes com alergias, em ambos, o género prevalente foi *Cladosporium* (26,3% em saudável, 29,4% em alérgica),

seguido por *Penicillium* (25,3%; 20,6%), *Aspergillus* (12,1%;11,7%) e *Alternaria* (7,6%;11,7%), observou-se um maior número de fungos em pacientes saudáveis em relação aos alérgicos, à exceção do género *Alternaria* que foi superior nos pacientes alérgicos. Em pacientes com sinusite crónica (Twarużek *et al.*, 2014), foram isolados fungos através da lavagem dos seios paranasais e de tecidos da mucosa e o isolamento foi maior na lavagem dos seios nasais, onde em 67% dos pacientes foram isolados fungos, neste estudo os géneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram os mais prevalentes (43% e 16%, respetivamente), seguido por *Cladosporium* (11%), *Fusarium* (7%), *Acremonium*, *Eurotium* (4%), *Alternaria* (2%), *Chaetomium* (1%), *Geotrichum* (1%), *Verticillium* (1%), *Rhizopus* (1%). Num estudo realizado por Trablesi *et al.* (2018), em amostras nasais de pacientes com asma não controlada, foi observado que as frequências de ataques de asma estavam relacionadas com a concentração de esporos de *Alternaria* no ar. *Aspergillus* foi o género fúngico prevalente (89%), seguido por *Penicillium* (5%), *Alternaria* (4%), *Chrysosporium* (1%) e *Aureobasidium* (1%) e ainda foi encontrado uma relação da frequência de asma à exposição a animais e plantas. Nestes estudos, foi visto que os alérgenos fúngicos dos géneros *Aspergillus*, *Alternaria* e *Cladosporium*, estão presentes nas mucosas nasais e estes podem induzir hipersensibilidade em indivíduos suscetíveis (Twarużek *et al.*, 2014).

No nosso estudo as flores colhidas pertenciam a duas classes diferentes, Liliatae e Magnoliopsida. A classe Magnoliopsida apresentou a maior ocorrência de isolamento de géneros fúngicos, mas só ocorreram diferenças significativas para os géneros *Alternaria* e *Penicillium*. Num estudo de Manganyi *et al.* (2018), em plantas da espécie *Pelargonium sidoides*, que pertence à classe Magnoliopsida, predominaram os fungos do género *Penicillium* (23%), seguido por *Fusarium* (12%), enquanto *Alternaria* e *Aspergillus* representaram 11% dos fungos identificados. Já num estudo em tecidos frescos de *Dioscorea zingiberensis* (Xiang *et al.*, 2018), espécie pertencente à classe Liliatae, o género *Fusarium* (23,6%) e *Alternaria* (17,1%) foram os mais predominantes sendo *Penicillium* dos menos frequentes.

Num estudo realizado em seis plantas medicinais diferentes, pertencentes à classe Magnoliopsida, os géneros mais frequentes foram *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mycelia sterilia* (Uzma *et al.*, 2016), e um outro estudo realizado em cinco plantas medicinais diferentes, foram isolados os géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Chaetomium*, *Drechslera*, *Curvularia*, *Bipolaris*,

Paecilomyces, *Emericella* e *Aspergillus* (Khiralla *et al.*, 2015), sendo que neste estudo, os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* não foram isolados, ao contrário do estudo anterior e do nosso estudo, onde estes dois gêneros foram frequentes (60,3% e 48,8%, respetivamente).

O isolamento do género *Fusarium* na Ordem Ericales foi significativamente mais elevado em relação às outras ordens em estudo. Num estudo em raízes de *Chenopodium quinoa* (Ordem Caryophyllales), o género *Penicillium* foi o mais prevalente (59%), seguido de *Fusarium* e *Phoma* (<15%) (González-Teuber *et al.*, 2017), contrariamente, num estudo da planta *Sceletium tortuosum* (Manganyi *et al.*, 2018), também pertencente à ordem Caryophyllales, *Fusarium* foi o género mais prevalente, seguindo-se de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Alternaria*. Neste último estudo, o género prevalente foi *Aspergillus* e no nosso estudo este género foi dos menos prevalentes (6,6%).

Em todas as flores foi possível isolar pelo menos um género fúngico, nas azáleas só foi isolado o género *Cladosporium*, já as rosas apresentaram o maior número de isolados e diversidade de gêneros fúngicos e os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* foram significativamente superiores nas camélias. As diferentes espécies de plantas aqui mencionadas, apresentam diferenças nos isolados fúngicos, isto pode dever-se ao facto de cada espécie de planta ser diferente, quer em relação às estruturas físicas, morfologia, textura, tecidos mais ou menos duros, que pode alterar a absorção dos diferentes nutrientes e suas concentrações (Supaphon *et al.*, 2018).

As nossas amostras foram colhidas em duas épocas do ano diferentes, Outono e Inverno, o isolamento dos gêneros fúngicos foi sempre superior no Outono, mas só no género *Aspergillus* é que houve uma diferença significativa, sendo que só foi isolado no Outono. Num estudo realizado por Ghiasian *et al.* (2016), em isolados do ar, durante o Inverno, os gêneros prevalentes foram *Cladosporium* (30,9%), seguidos por *Penicillium* (27,3%), *Aspergillus* (24,5%) e *Alternaria* (3,3%), contrariamente ao nosso estudo em que o género *Aspergillus* não foi isolado no Inverno mas vai em concordância com a prevalência dos gêneros *Cladosporium* e *Penicillium*. Num estudo na cavidade nasal (Sellart-Altisent *et al.*, 2007), verificou-se que o género *Cladosporium* era mais frequente no inverno e *Penicillium* na primavera e verão e ainda *Alternaria*, na primavera era mais frequente sendo o segundo género mais frequente. Arikoglu *et al.* (2016) realizaram um estudo em ambiente externo, em que também obteve o género *Cladosporium* (76,8%) como o mais prevalente, seguindo-se por *Penicillium* (10,7%), *Aspergillus* (5,8%) e *Alternaria* (3,9%), neste estudo, foram avaliados os

níveis totais de fungos e demonstraram que foram significativamente maiores nos meses de Maio e Novembro. No entanto, no estudo de Fatahinia *et al.* (2018), em que são isolados do ar, as estações em estudo foram Outono e Primavera, e o número de isolados do género *Aspergillus* e *Penicillium* foram duas vezes superiores na Primavera. Noutro estudo semelhante, realizado por Shams-Ghahfarokhi *et al.* (2014), em que a época do ano foi o Verão, o género fúngico mais isolado foi *Aspergillus* (31,3%), seguido de *Cladosporium* (22,1%), *Penicillium* (13,8%) e *Alternaria* (12,2%), sendo que neste a prevalência de *Aspergillus* vai de encontro ao estudo anterior. Na espécie *Arabidopsis thaliana* (García *et al.*, 2013), a frequência de isolamento foi diferente consoante o mês de amostragem, sendo maior nos meses de março a junho, em que junho foi o mês de máxima frequência de isolamento e nos meses de junho a novembro a taxa de isolamento diminuiu, sendo que os autores relacionam isto com progresso do ciclo de vida desta planta, e não acharam relacionamento com as condições geográficas e climáticas e nem com a produtividade da planta.

Em relação ao local de colheita, o género *Cladosporium* foi o mais isolado em ambos os locais, que vai em concordância com o estudo de Fatahinia *et al.* (2018), onde foram isolados de sete regiões diferentes, e em todas elas, o género *Cladosporium* foi o fungo mais isolado. No presente estudo, o número de géneros fúngicos isolados nos dois locais de colheita, só foram significativos para dois géneros, o género *Aspergillus* no concelho de Vila Real e o género *Fusarium* no concelho de Tarouca, o género *Cladosporium* foi o género com menor significância, uma vez que só não foi encontrado numa amostra. Porém, num estudo realizado por Asl *et al.* (2017), em que foram colhidas amostras de ar, grãos, frutas e lixo, em três províncias diferentes, *Cladosporium* foi mais isolado na província de Teerã (48%) do que em Esfahan (26,1%) e Ardebil (23,3%). Porém, no estudo realizado por Ghiasian *et al.* (2016), em isolados do ar, não houve diferenças significativas em relação aos diferentes locais da cidade em estudo nem nas diferentes horas do dia em que as amostras foram colhidas. Em climas temperados e frios, o género *Penicillium* é o mais frequentemente isolado, enquanto que em regiões quentes e húmidas, *Aspergillus* é o mais frequente (Diguta *et al.*, 2015).

No geral, os géneros dominantes no nosso estudo e nos estudos mencionados são similares, possivelmente, porque são géneros que produzem uma quantidade superior de esporos e são cosmopolitas, o que leva a uma maior disseminação e que sejam encontrados em vários tipos de habitats (Jena *et al.*, 2015; Bandh *et al.*, 2016; Uzma *et al.*, 2016).

Para avaliar a variabilidade genética entre os isolados de cada género utilizou-se os ISSRs. Esta técnica é considerada adequada para o estudo de diversidade genética e em estudos filogenéticos em fungos (Mahmoud *et al.*, 2016) e é uma técnica simples, rápida e altamente reprodutível (Mahmoud *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017). Em estudos, que utilizaram ISSRs para estudar a diversidade genética e identificação espécies, os ISSRs mostraram-se eficazes e capazes de detetar alta diversidade genética (Merlera *et al.*, 2015; Mahmoud *et al.*, 2016). De acordo com a pesquisa biobibliográfica realizada, não foram encontrados estudos com ISSRs para os géneros *Cladosporium* e *Penicillium*.

No conjunto de “primers” testados, foram selecionados 8 para cada género. No género *Cladosporium*, foram utilizadas 9 amostras e obteve-se uma percentagem de polimorfismo de 99,2%, demonstrando uma elevada variabilidade intraespecífica. Já na espécie *Aspergillus*, onde 7 amostras foram testadas, a taxa de polimorfismo foi de 96,4%, sendo esta menor ao género *Cladosporium*, mas ainda assim mostrando uma elevada variabilidade intraespecífica. Para o género *Penicillium* e espécie *T. marneffei* foram usadas 10 e 2 amostras, respetivamente, e a percentagem de polimorfismo foi de 92,6%, sendo que esta foi menor que os dois géneros anteriores.

Num estudo realizado por Houshyarfard *et al.* (2015), para avaliar a relação genética e polimorfismo entre isolados não-aflatoxigénicos de *A. flavus* de amostras de pistáchio, amendoim e milho, verificaram-se percentagens de polimorfismo de 95,7% e 66,7% e concluíram que os dois “primers” em estudo demonstraram números significativos de polimorfismo, e assim uma elevada variabilidade intraespecífica entre os isolados de *A. flavus*, demonstrando que a análise por ISSRs é uma ferramenta útil para identificação de polimorfismo entre isolados não-aflatoxigénicos de *A. flavus*.

Ao analisar os dendrogramas com as relações filogenéticas obtidas verifica-se a existência de elevada variabilidade.

No género *Cladosporium*, as amostras obtidas apresentavam muita similitude a nível da análise macroscópica, sendo difícil distinguir espécies, porém na tentativa de agrupar as amostras, a amostra 36.2, pertencente ao grupo I dos dendrogramas, foi o mais distinto de entre todas as amostras, sendo que as restantes amostras deste grupo eram todas muito similares e no grupo II à uma subdivisão, uma vez que a amostra 38.1 apresentou um verde bem mais claro em comparação com as restantes amostras deste grupo. Neste género, estes

grupos não apresentaram diferenças quando comparado os locais de colheita, época do ano ou espécie da flor.

O género *Aspergillus* dividiu-se em três grupos, neste género foi possível distinguir espécies, sendo que o grupo I pertence ao complexo *niger* e o grupo II ao complexo *flavus*, no que diz respeito ao grupo III, não foi possível determinar espécie, mas verificou-se que era muito diferente em relação às amostras dos grupos anteriores. Pode-se verificar que no local Tarouca só uma amostra foi isolada, pertencendo ao complexo *flavus*, sendo que não houve relação das espécies com a época do ano ou espécie da flor.

No que diz respeito ao dendrograma do género *Penicillium* e espécie *Talaromyces marneffeii*, verificou-se que há uma divisão entre os dois isolados de *T. marneffeii* (grupo IV) e as restantes amostras de *Penicillium*. Em relação ao género *Penicillium*, na análise macroscópica, verificou-se que havia algumas diferenças distintas, nos dendrogramas formaram-se três grupos, sendo que o grupo I e o grupo II são só constituídos por uma amostra cada um sendo que cada uma destas amostras era bem distintas das restantes do género. No grupo III, ainda se verificou três subdivisões em comparação com a análise macroscópico, sendo uma divisão constituído as amostras 25.2 e 26.3, outra divisão com as amostras 41.5 e 45.3 e a última divisão com as restantes amostras. Neste género estes grupos não apresentaram diferenças quando comparado os locais de colheita, época do ano ou espécie da flor.

Num estudo realizado por Al-Wadai *et al.* (2013), em isolados de culturas de trigo, três “primers” foram usados para os dendrogramas de ISSR, tendo sido considerados úteis para investigar a diversidade e estrutura populacional de *A. flavus* e verificaram que não houve uma relação clara entre os agrupamentos no dendrograma e a origem geográfica das amostras. Em concordância, um estudo realizado por Mahmoud *et al.* (2014), em isolados de milho, o dendrograma não mostrou relação entre o agrupamento dos isolados e a origem geográfica. Também num estudo realizado por Divakara *et al.* (2015) em sementes de sorgo, verificaram que não houve divisão baseada na geografia, mas verificaram uma grande diversidade para esta espécie nas diferentes regiões em estudo. Num estudo de Batista *et al.* (2008), em 15 substratos diferente, analisando o dendrograma houve logo uma divisão de *A. niger* e os restantes isolados, e demonstrou um grupo principal pertencente a *A. flavus*, este foi dividido em dois subgrupos, onde um dos grupos pertenciam a isolados do estado de Pernambuco, demonstrando haver uma alta similaridade genética de acordo com a origem

geográfica, contrariando os estudos anteriores. Em concordância com este último estudo, mas na espécie *A. terreus* de isolados clínicos, realizado por Neal *et al.* (2011), concluíram que haveria uma ligação entre a similaridade genética e a origem geográfica das amostras.

O diagnóstico de infecções fúngicas é um desafio, ensaios de Nested-PCR são utilizados para a detecção de fungos patogênicos (Zeng *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016), este método tem uma forte capacidade de amplificação de DNA (Lu *et al.*, 2015), e é sensível e específico, pois, demonstrou eficácia na detecção específica de muitos fungos (Vanittanakom *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2016).

Há vários estudos em que a técnica de nested PCR foi utilizada para identificar *T. marneffei* e que demonstraram uma alta especificidade e sensibilidade, como num estudo realizado por Lu *et al.* (2016) em amostras de sangue total, também num estudo por Liu *et al.* (2016), em tecidos frescos e em fluidos de lavagem broncoalveolar, concordam com estes, num estudo de Zeng *et al.*, (2009), Nested PCR demonstrou alta especificidade e sensibilidade em tecidos embebidos em parafina, e mais uma vez um estudo com amostras de soro concordou com os estudos anteriores (Pongpom *et al.*, 2009). Num estudo realizado por Vanittanakom *et al.* (2002), com amostras isoladas em humanos, ratos de bambu e solo, nested PCR demonstrou ser específico para *T. marneffei*, independentemente, de o fungo ser isolado em humanos ou em habitats naturais.

Nested-PCR, utilizando o conjunto de “primers”, ITS4, ITS5, PM-F e PM-R, mostrou ser específico para a espécie *T. marneffei* (Lu *et al.*, 2016). Os “primers” ITS4 e ITS5 amplificam uma região específica para fungos, enquanto que os “primers” PM-F e PM-R, amplificam especificamente para a espécie *T. marneffei* (Lu *et al.*, 2016). Para evitar contaminações ou erros, um controlo negativo e um controlo positivo foram acrescentados à reação (Pongpom *et al.*, 2009).

No nosso trabalho, foram isolados dois *T. marneffei* e realizou-se o ensaio de Nested-PCR para confirmar a espécie. Na primeira reação a segunda amostra não amplificou, podendo ser justificado por uma menor quantidade de DNA, que não permitiu a visualização em gel, uma vez que na segunda reação ambas as amostras amplificaram, verificando-se uma banda de, aproximadamente, 101 pb, confirmando assim ser *T. marneffei*.

Para uma identificação mais precisa de uma espécie, apesar de ser mais trabalhosa, é o método de sequenciamento do produto de PCR (Xu, 2006), sendo este, considerado o teste de

laboratório final (Farkas *et al.*, 2014). No nosso trabalho, a identidade da sequência foi 100% e 98% para a espécie *T. marneffe*, ficando assim provado, que as duas amostras pertenciam à espécie *T. marneffe*. Neste estudo as técnicas de Neted-PCR e sequenciação mostraram ser eficazes para a identificação molecular de *T. marneffe*.

6. Conclusão

Neste trabalho, em todas as amostras foi possível isolar e identificar, pelo menos um género fúngico, no total 6 géneros fúngicos (*Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Mucor*) e 1 espécie foram identificados (*Talaromyces marneffe*). Ficou claro que o género *Cladosporium* foi prevalente, independentemente, do local de colheita, época de colheita ou da classe, ordem, família ou espécie a que a flor pertence. Nos dois locais de colheita, houve um género em cada local que foi significativamente superior em relação ao outro (*Aspergillus* em Vila Real; *Fusarium* em Tarouca) e no Outono o isolamento de géneros fúngicos foi sempre superior, mas só no género *Aspergillus* é que foi significativamente superior, uma vez que só ocorreu nesta época do ano.

Apesar de as flores já serem proibidas em hospitais, a presença delas em habitats ou o ato de oferecer flores para animar um familiar ou amigo que tenho saído do hospital, principalmente, pacientes que tenham sofrido uma intervenções cirúrgicas e tratamentos com imunodepressores, que tenham o seu sistema imunitário enfraquecido sendo que estes géneros são oportunistas e pode levar a uma infeção fúngica, que pode ser difícil de detetar e com uma taxa de mortalidade preocupante. Embora seja mais frequente infeções fúngicas em pacientes imunodeprimidos, há casos de pacientes imunocompetentes com infeções fúngicas, bem como pacientes com uma maior sensibilização a alérgenos fúngicos que pode levar ao desenvolvimento ou agravamento de doenças alérgicas, como o caso da asma. Podendo assim, ser um risco para a saúde pública manter, frequentemente, flores por perto.

Dos três géneros, testados pela técnica de ISSRs, o género *Cladosporium* foi o que apresentou uma maior taxa de polimorfismo (99,3%), apresentado uma elevada variabilidade intraespecífica, seguido pelo género *Aspergillus* (96,4%) e o género *Penicillium* foi o que apresentou uma menor taxa de polimorfismo (90,1%). Já o que diz respeito às relações filogenéticas, o género *Penicillium* foi o que obteve uma maior diversidade, seguido de *Cladosporium* e *Aspergillus*.

Os dois isolados identificadas como *Talaromyces marneffe*, por técnicas microbiológicas, foram sujeitos à técnica Nested-PCR e sequenciamento, para confirmação da espécie e ambos os resultados deram positivo.

Como perspectivas futuras poderia ser efetuado um estudo que incluísse os meses de Primavera e Verão, como nos artigos referidos, houve estudos com uma maior taxa de colonização nesses meses e géneros de *Aspergillus* e *Alternaria* tiveram uma maior prevalência, sendo que *Alternaria* como fungo alergénico, seria importante saber se a prevalência aumentariam e talvez justificar algumas alergias causados por flores. Neste estudo, em 62,8% das floras encontraram-se géneros que não foi possível identificar, assim, melhorias nas técnicas/métodos de identificação podiam ser realizadas. As flores em estudo, foram colhidas de jardins, um estudo em flores de estufas e de floristas, poderia ser realizado, uma vez que são ambientes diferentes e podendo haver diferenças nos isolados e prevalência dos géneros, e como são comumente oferecidas e arranjos destas são feitos para casas e ambientes internos, o que leva a um aumento de contacto, seria importante.

7. Referências Bibliográficas

- Abdelwahab, M. F., Fouad, M. A., Kamel, M. S., Özkaya, F. C., Kalscheuer, R., Müller, W. E., Lin, W., Liu, Z., Ebrahim, W., Daletos, G. e Proksch, P. (2018). Tanzawaic acid derivatives from freshwater sediment-derived fungus *Penicillium* sp. *Fitoterapia*, **128**, 258-264.
- Afshari, S. A. K., Rahimi, H., Hashemi, S. J., Ghazvini, R. D., Badali, H., Gharehbolagh, S. A. e Rezaie, S. (2017). Evaluation of PCR-reverse line blot hybridization assay for simultaneous identification of medically important saprophytic fungi. *Journal de Mycologie Medicale*, **28**(1), 173-179.
- Al-Enazi, N. M., Awaad, A. S., Al-Othman, M. R., Al-Anazi, N. K. e Alqasoumi, S. I. (2018). Isolation, identification and anti-candidal activity of filamentous fungi from Saudi Arabia soil. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **26**(2), 253-257.
- Andersen, B., Nielsen, K. F., Pinto, V. F. e Patriarca, A. (2015). Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. *International Journal of Food Microbiology*, **196**, 1-10.
- Andrade-Linares, D. R., Veresoglou, S. D. e Rillig, M. C. (2016). Temperature priming and memory in soil filamentous fungi. *Fungal Ecology*, **21**, 10-15.
- Arikoglu, T., Batmaz, S. B., Coşkun, T., Otag, F., Yildirim, D. D. e Kuyucu, S. (2016). The characteristics of indoor and outdoor fungi and their relation with allergic respiratory diseases in the southern region of Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, **188**(6), 380.
- Asam, S. e Rychlik, M. (2015). Recent developments in stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis with special regard to *Alternaria* toxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **407**(25), 7563-7577.
- Asl, I. G., Motamedi, M., Shokuhi, G. R., Jalalizand, N., Farhang, A. e Mirhendi, H. (2017). Molecular characterization of environmental *Cladosporium* species isolated from Iran. *Current Medical Mycology*, **3**(1), 1.
- Bandh, S. A., Kamili, A. N., Ganai, B. A. e Lone, B. A. (2016). Opportunistic fungi in lake water and fungal infections in associated human population in Dal Lake, Kashmir. *Microbial Pathogenesis*, **93**, 105-110.
- Barbosa, R. N., Bezerra, J. D., Souza-Motta, C. M., Frisvad, J. C., Samson, R. A., Oliveira, N. T. e Houbraken, J. (2018). New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. *Antonie van Leeuwenhoek*, **111**(10), 1883-1912.
- Baxi, S. N., Portnoy, J. M., Larenas-Linnemann, D. e Phipatanakul, W. (2016). Exposure and health effects of fungi on humans. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, **4**(3), 396-404.
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z. e Crous, P. W. (2012). The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, **72**, 1-401.

- Bensch, K., Groenewald, J. Z., Braun, U., Dijksterhuis, J., de Jesús Yáñez-Morales, M. e Crous, P. W. (2015). Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, **82**, 23-74.
- Blum, G., Kainzner, B., Grif, K., Dietrich, H., Zeiger, B., Sonnweber, T. e Lass-Flörl, C. (2013). In vitro and in vivo role of heat shock protein 90 in amphotericin B resistance of *Aspergillus terreus*. *Clinical Microbiology and Infection*, **19**(1), 50-55.
- Carvalho, V. M., Vanstreels, R. E., Paula, C. D., Kolesnikovas, C. K., Ramos, M. C. C., Coutinho, S. D., Martins, C. S., Pissinatti, A. e Catão-Dias, J. L. (2014). Nasal, oral and rectal microbiota of Black lion tamarins (*Leontopithecus chrysopygus*). *Brazilian Journal of Microbiology*, **45**(4), 1531-1539.
- Chaiwun, B., Vanittanakom, N., Jiviriyawat, Y., Rojanasthien, S. e Thorner, P. (2011). Investigation of dogs as a reservoir of *Penicillium marneffe* in northern Thailand. *International Journal of Infectious Diseases*, **15**(4), 236-239.
- Chi, X. H., Xue, Y. M., Wang, Q. S., Li, G. P., Zhou, H. S. e Qi, Y. S. (2017). Diagnosis and treatment of diffusible *Penicillium marneffe* in human immunodeficiency virus-negative patients: A challenge for the physician. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **35**(4), 617
- Chong, G. M., Vonk, A. G., Meis, J. F., Dingemans, G. J. H., Houbraken, J., Hagen, F., Gaajetaan, G. R., van Tegelen, D. W. E., Simons, G. F. M. e Rijnders, B. J. A. (2017). Interspecies discrimination of *A. fumigatus* and siblings *A. lentulus* and *A. felis* of the *Aspergillus* section *Fumigati* using the AsperGenius® assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **87**(3), 247-252.
- Conti, P., Tettamanti, L., Mastrangelo, F., Ronconi, G., Frydas, I., Kritas, S. K., Caraffa, A. e Pandolfi, F. (2018). Impact of fungi on immune responses. *Clinical Therapeutics*, **40**(6), 885-888.
- da Cruz Cabral, L., Rodriguero, M., Stenglein, S., Nielsen, K. F. e Patriarca, A. (2017). Characterization of small-spored *Alternaria* from Argentinean crops through a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, **257**, 206-215.
- Diguta, C. F., Vincent, B., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H. e Rousseaux, S. (2011). PCR ITS-RFLP: a useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiology*, **28**(6), 1145-1154
- Diguta, C. F., Ursu, L., Ciuca, M., Matei, F. e Cornea, C. P. (2015). Moulds Presence on Indigenous Grape Varieties from Miniş-Măderat Vineyard. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, **6**, 554-558.
- Docampo, S., Trigo, M. M., Recio, M., Melgar, M., Garcia-Sanchez, J., Calderon-Ezquerro, M. C. e Cabezudo, B. (2010). High incidence of *Aspergillus* and *Penicillium* spores in the atmosphere of the cave of Nerja (Malaga, southern Spain). *Aerobiologia*, **26**(2), 89-98.
- Estrada, M. E., Camacho, M. V. e Benito, C. (2007). The molecular diversity of different isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as assessed using intermicrosatellites (ISSRs). *Cellular & Molecular Biology Letters*, **12**(2), 240.

- Farkas, D. H. (2014). On to the Next Phase of Molecular Diagnostics—The Ultimate Laboratory Test: In Observance of the 20th Anniversary of the Annual Meeting of the Association for Molecular Pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics*, **16**(6), 599-600.
- Fatahinia, M., Zarei-Mahmoudabadi, A., Shokri, H. e Ghaymi, H. (2018). Monitoring of mycoflora in outdoor air of different localities of Ahvaz, Iran. *Journal de Mycologie Medicale*, **28**(1), 87-93.
- Fernández-Rodríguez, S., Sadyś, M., Smith, M., Tormo-Molina, R., Skjøth, C. A., Maya-Manzano, J. M., Silva-Palacios, I. e Gonzalo-Garijo, Á. (2015). Potential sources of airborne *Alternaria* spp. spores in South-west Spain. *Science of the Total Environment*, **533**, 165-176.
- Figueiredo, R. T. e Neves, J. S. (2018). Eosinophils in fungal diseases: An overview. *Journal of Leukocyte Biology*, **104**(1), 49-60.
- Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D. e Gurr, S. J. (2018). Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, **360**(6390), 739-742.
- Frías-De-León, M. G., Rosas-de Paz, E., Arenas, R., Atoche, C., Duarte-Escalante, E., de Soschin, D. M., Acosta-Altamirano, G. e Reyes-Montes, M. R. (2018). Identification of *Aspergillus tubingensis* in a primary skin infection. *Journal de Mycologie Medicale*, **28**(2), 274-278.
- Gabriel, M. F., Postigo, I., Tomaz, C. T. e Martínez, J. (2016). *Alternaria alternata* allergens: markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. *Environment International*, **89**, 71-80.
- García, E., Alonso, Á., Platas, G. e Sacristán, S. (2013). The endophytic mycobiota of *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Diversity*, **60**(1), 71-89.
- Garcia-Vidal, C., Royo-Cebrecos, C., Peghin, M., Moreno, A., Ruiz-Camps, I., Cervera, C., Belmonte, J., Gudío, C., Laboril, M., Rosell, E. e de la Bellacasa, J. P. (2014). Environmental variables associated with an increased risk of invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology and Infection*, **20**(11), O939-O945.
- Gauthier, G. M. e Keller, N. P. (2013). Crossover fungal pathogens: the biology and pathogenesis of fungi capable of crossing kingdoms to infect plants and humans. *Fungal Genetics and Biology*, **61**, 146-157.
- Ghiasian, S. A., Maghsood, A. H. e Aghamirian, M. R. (2016). Aeromycological analysis of allergenic airborne fungi in Qazvin, Iran. *Current Medical Mycology*, **2**(3), 5.
- González-Teuber, M., Vilo, C. e Bascuñán-Godoy, L. (2017). Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama Desert, Chile. *Genomics Data*, **11**, 109-112.
- Groot, M. N., Abee, T. e van Bokhorst-van de Veen, H. (2018). Inactivation of conidia from three *Penicillium* spp. isolated from fruit juices by conventional and alternative mild preservation technologies and disinfection treatments. *Food Microbiology*.

- Gruber-Dorninger, C., Novak, B., Nagl, V. e Berthiller, F. (2016). Emerging mycotoxins: Beyond traditionally determined food contaminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65**(33), 7052-7070.
- Haueisen, J. e Stukenbrock, E. H. (2016). Life cycle specialization of filamentous pathogens- colonization and reproduction in plant tissues. *Current Opinion in Microbiology*, **32**, 31-37.
- Hayette, M. P., Christiaens, G., Mutsers, J., Barbier, C., Huynen, P., Melin, P. e De Mol, P. (2010). Filamentous fungi recovered from the water distribution system of a Belgian university hospital. *Medical Mycology*, **48**(7), 969-974.
- Houbraken, J. e Samson, R. A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology*, **70**, 1-51.
- Hu, W., Ran, Y., Zhuang, K., Lama, J. e Zhang, C. (2015). *Alternaria arborescens* infection in a healthy individual and literature review of cutaneous alternariosis. *Mycopathologia*, **179**(1-2), 147-152.
- Hu, Y., Zhang, J., Li, X., Yang, Y., Zhang, Y., Ma, J. e Xi, L. (2013). *Penicillium marneffeii* infection: an emerging disease in mainland China. *Mycopathologia*, **175**(1-2), 57-67.
- Imbert, S., Brossas, J. Y., Palous, M., Joly, I., Meyer, I. e Fekkar, A. (2017). Performance of *Aspergillus* PCR in cerebrospinal fluid for the diagnosis of cerebral aspergillosis. *Clinical Microbiology and Infection*, **23**(11), 889.
- Iskandar, N. L., Zainudin, N. A. I. M. e Tan, S. G. (2011). Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*, **23**(5), 824-830.
- Jena, S. K., Tayung, K., Rath, C. C. e Parida, D. (2015). Occurrence of culturable soil fungi in a tropical moist deciduous forest Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India. *Brazilian Journal of Microbiology*, **46**(1), 85-96.
- Kates, S. G., McGinley, K. J., Larson, E. L. e Leyden, J. J. (1991). Indigenous multiresistant bacteria from flowers in hospital and nonhospital environments. *American Journal of Infection Control*, **19**(3), 156-161.
- Kespohl, S. e Raulf, M. (2014). Mould allergens: Where do we stand with molecular allergy diagnostics?. *Allergo Journal International*, **23**(4), 120-125.
- Khan, F. (2015). Molecular Markers: An Excellent Tool for Genetic Analysis. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*, **6**(3), 1.
- Khiralla, A., Mohamed, I., Thomas, J., Mignard, B., Spina, R., Yagi, S. e Laurain-Mattar, D. (2015). A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **8**(9), 701-704.
- Kidd S., Ellis D., Davis S., Halliday, C. L. e Alexiou, H (2016). Descriptions of Medical Fungi. 3ª Edição. Pfizer e ANZMIG. Adelaide, Austrália.
- Kocsubé, S., Perrone, G., Magistà, D., Houbraken, J., Varga, J., Szigeti, G., Hubka, V., Hong, S.-B., Frisvad, J.C. e Samson, R. A. (2016). *Aspergillus* is monophyletic: evidence

- from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Studies in Mycology*, **85**, 199-213.
- Rojas-Aedo, J. F., Gil-Durán, C., Goity, A., Vaca, I., Levicán, G., Larrondo, L. F. e Chávez, R. (2018). The developmental regulator *Pcz1* affects the production of secondary metabolites in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti*. *Microbiological Research*, **212**, 67-74.
- Kumar, M. e Mugunthan, M. (2017). Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures. *Medical Journal Armed Forces India*, **74**(4), 333-336.
- Kustrzeba-Wójcicka, I., Siwak, E., Terlecki, G., Wolańczyk-Mędrala, A. e Mędrala, W. (2014). *Alternaria alternata* and its allergens: a comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, **47**(3), 354-365.
- LaCharity, L. A. e McClure, E. R. (2003). Are plants vectors for transmission of infection in acute care?. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, **15**(1), 119-24.
- Lanternier, F., Cypowyj, S., Picard, C., Bustamante, J., Lortholary, O., Casanova, J. L. e Puel, A. (2013). Primary immunodeficiencies underlying fungal infections. *Current Opinion in Pediatrics*, **25**(6), 736.
- Lawrence, D. P., Gannibal, P. B., Peever, T. L. e Pryor, B. M. (2013). The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. *Mycologia*, **105**(3), 530-546.
- Liofilchem® - Potato Dextrose Agar - Rev.0 / 31.08.2016 [Consult. 18 Setembro.2018]. Disponível em: http://www.liofilchem.net/login/pd/ifu/11199_IFU.
- Lin, W. R., Wang, P. H., Chen, W. C., Lai, C. M. e Winder, R. S. (2016). Responses of soil fungal populations and communities to the thinning of *Cryptomeria japonica* Forests. *Microbes and Environments*, **31**(1), 19-26.
- Lin, X., Zhou, X., Wang, F., Liu, K., Yang, B., Yang, X., Peng, Y., Liu, J., Ren, Z. e Liu, Y. (2012). A new cytotoxic sesquiterpene quinone produced by *Penicillium* sp. F00120 isolated from a deep sea sediment sample. *Marine Drugs*, **10**(1), 106-115.
- Liu, Y., Huang, X., Yi, X., He, Y., Mylonakis, E. e Xi, L. (2016). Detection of *Talaromyces marneffe* from fresh tissue of an inhalational murine pulmonary model using nested PCR. *PloS One*, **11**(2), e0149634.
- López, P., Venema, D., Mol, H., Spanjer, M., de Stoppelaar, J., Pfeiffer, E. e de Nijs, M. (2016). *Alternaria* toxins and conjugates in selected foods in the Netherlands. *Food Control*, **69**, 153-159.
- Lorenzini, M., Cappello, M. S., Logrieco, A. e Zapparoli, G. (2016). Polymorphism and phylogenetic species delimitation in filamentous fungi from predominant mycobiota in withered grapes. *International Journal of Food Microbiology*, **238**, 56-62.
- Lu, S., Li, X., Calderone, R., Zhang, J., Ma, J., Cai, W. e Xi, L. (2015). Whole blood nested PCR and real-time PCR amplification of *Talaromyces marneffe* specific DNA for diagnosis. *Sabouraudia*, **54**(2), 162-168.
- Mahmoud, M. A., El-Samawaty, A. M. A., Yassin, M. A. e El-Aziz, A. A. (2016). Genetic diversity analysis of *Aspergillus flavus* isolates from plants and air by ISSR markers. *Genetics and Molecular Research: GMR*, **15**(2).

- Manganyi, M. C., Regnier, T., Kumar, A., Bezuidenhout, C. C. e Ateba, C. N. (2018). Biodiversity and antibacterial screening of endophytic fungi isolated from *Pelargonium sidoides*. *South African Journal of Botany*, **116**, 192-199.
- Manganyi, M. C., Regnier, T., Kumar, A., Bezuidenhout, C. C. e Ateba, C. N. (2018). Phylogenetic analysis and diversity of novel endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sceletium tortuosum*. *Phytochemistry Letters*, **27**, 36-43.
- Menezes, C. P., de Lima Perez, A. L. A. e Oliveira, E. L. (2017). *Cladosporium* spp: Morfologia, infecções e espécies patogênicas. *Acta Brasiliensis*, **1**(1), 23-27.
- Merlera, G. G., Muñoz, S., Coelho, I., Cavaglieri, L. R., Torres, A. M. e Reynoso, M. M. (2015). Diversity of black Aspergilli isolated from raisins in Argentina: polyphasic approach to species identification and development of SCAR markers for *Aspergillus ibericus*. *International Journal of Food Microbiology*, **210**, 92-101.
- Morán, G., Uberti, B., Orloff, A. e Folch, H. (2017). *Aspergillus fumigatus* - sensitive IgE is associated with bronchial hypersensitivity in a murine model of neutrophilic airway inflammation. *Journal de Mycologie Medicale*, **28**(1), 128-136.
- Ng, W. L. e Tan, S. G. (2015). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. *ASM Sci J*, **9**(1), 30-39.
- Nguyen, P. A., Strub, C., Fontana, A. e Schorr-Galindo, S. (2017). Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. *Biological Control*, **104**, 10-27.
- Nonaka, K., Todaka, N., Ōmura, S. e Masuma, R. (2014). Combination cellulose plate (non-agar solid support) and agar plate method improves isolation of fungi from soil. *The Journal of Antibiotics*, **67**(11), 755.
- Oliveira, H., Santos, C., Paterson, R. R. M., Gusmão, N. B. e Lima, N. (2016). Fungi from a groundwater-fed drinking water supply system in Brazil. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **13**(3), 304.
- Oliveira, L. G., Cavalcanti, M. A. Q., Fernandes, M. J. S. e Lima, D. M. M. (2013). Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. *Journal of Arid Environments*, **95**, 49-54
- Pal, S. e Ghosh, S. K. (2014). Diversity of soil fungi in North 24 Parganas and their antagonistic potential against *Leucinodes orbonalis* Guen. (Shoot and fruit borer of brinjal). *Environmental Monitoring and Assessment*, **186**(12), 8707-8716.
- Pongpom, M., Sirisanthana, T. e Vanittanakom, N. (2009). Application of nested PCR to detect *Penicillium marneffeii* in serum samples. *Sabouraudia*, **47**(5), 549-553.
- Prakash, P. Y. e Bhargava, K. (2016). A modified micro chamber agar spot slide culture technique for microscopic examination of filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods*, **123**, 126-129.
- Prakash, P. Y., Irinyi, L., Halliday, C., Chen, S., Robert, V. e Meyer, W. (2017). Online Databases for the Taxonomy and Identification of Pathogenic Fungi and Proposal for a Cloud-based Dynamic Data Network Platform. *Journal of Clinical Microbiology*, **55**(4), 1011-1024.

- Prata, A.C.B. (2007). Diagnóstico Laboratorial de Micoses Humanas - Métodos Convencionais vs Métodos Moleculares, Aveiro, Universidade de Aveiro.
- Prester, L. (2011). Indoor exposure to mould allergens. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, **62**(4), 371-379.
- Rafla, K. e Tredget, E. E. (2011). Infection control in the burn unit. *Burns*, **37**(1), 5-15.
- Razafinarivo, J., Jany, J. L., Crous, P. W., Looten, R., Gaydou, V., Barbier, G., Mounier, J. e Vasseur, V. (2016). *Cladosporium lebrasiae*, a new fungal species isolated from milk bread rolls in France. *Fungal Biology*, **120**(8), 1017-1029.
- Rick, E. M., Woolnough, K., Pashley, C. H. e Wardlaw, A. J. (2016). Allergic Fungal Airway Disease, **26**(6), 344-354.
- Rico-Munoz, E., Samson, R. A. e Houbraken, J. (2018). Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. *Food Microbiology*, 1-12.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Andrade, M. J. e Córdoba, J. J. (2015). Detection of filamentous fungi in foods. *Current Opinion in Food Science*, **5**, 36-42.
- Rotondo, F., Hong, S. G., Peever, T. e Pryor, B. M. (2018). Molecular diversity and allergenic profiles of *Alternaria* spp. from desert environments in Arizona. *Fungal Biology*, **122**(1), 74-85.
- Sahu, M. C. e Padhy, R. N. (2014). Bayesian evaluation of two conventional diagnostic methods for pathogenic fungal infections. *Journal of Acute Medicine*, **4**(3), 109-119.
- Sellart-Altisent, M., Torres-Rodríguez, J. M., de Ana Gómez, S. e Alvarado-Ramírez, E. (2007). Nasal fungal microbiota in allergic and healthy subjects. *Revista Iberoamericana de Micología*, **24**(2), 125-130.
- Serna-Domínguez, M. G., Andrade-Michel, G. Y., Arredondo-Bernal, H. C. e Gallou, A. (2018). Two efficient methods for isolation of high-quality genomic DNA from entomopathogenic fungi. *Journal of Microbiological Methods*, **148**, 55-63.
- Shams-Ghahfarokhi, M., Aghaei-Gharehbolagh, S., Aslani, N. e Razzaghi-Abyaneh, M. (2014). Investigation on distribution of airborne fungi in outdoor environment in Tehran, Iran. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, **12**(1), 54.
- Shapiro, J. T., dos Santos, T. M. R., Marchetti, C. R., Lorenz-Lemke, A. P., Delarmelina, E. e Bordignon, M. O. (2015). Characterization of fungi associated with the nasal hairs of Molossid bats. *Fungal Ecology*, **18**, 126-129.
- Si, Z. e Qiao, J. (2017). *Talaromyces marneffeii* Infection. *New England Journal of Medicine*, **377**(26), 2580-2580.
- Sibao, W. A. N. G., Xuexia, M. I. A. O., Weiguo, Z. H. A. O., Huang, B., Meizhen, F. A. N., Zengzhi, L. I. e Huang, Y. (2005). Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). *Mycological Research*, **109**(12), 1364-1372.
- Siciliano, I., Ortega, S. F., Gilardi, G., Bosio, P., Garibaldi, A. e Gullino, M. L. (2018). Molecular phylogeny and characterization of secondary metabolite profile of plant pathogenic *Alternaria* species isolated from basil. *Food Microbiology*, **73**, 264-274.

- Solfrizzo, M. (2017). Recent advances on *Alternaria* mycotoxins. *Current Opinion in Food Science*, **17**, 57-61.
- Solhaug, A., Eriksen, G. S. e Holme, J. A. (2016). Mechanisms of action and toxicity of the mycotoxin alternariol: A review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **119**(6), 533-539.
- Supaphon, P., Keawpiboon, C., Preedanon, S., Phongpaichit, S. e Rukachaisirikul, V. (2018). Isolation and antimicrobial activities of fungi derived from *Nymphaea lotus* and *Nymphaea stellata*. *Mycoscience*, **59**(5), 415-423.
- Thanh, N. T., Liem, N. T., Shikuma, C., Day, J. N., Thwaites, G. e Le, T. (2016). Clinical features of three patients with paradoxical immune reconstitution inflammatory syndrome associated with *Talaromyces marneffei* infection. *Medical Mycology Case Reports*, **19**, 33-37.
- Trablesi, H., Hadrich, I., Neji, S., Fendri, N., Ghorbel, D., Makni, F., Ayadi, H., Kammoun, S. e Ayadi, A. (2018). Environmental and molecular study of fungal flora in asthmatic patients. *Journal de Mycologie Medicale*, **28**(1), 180-185.
- Tralamazza, S. M., Piacentini, K. C., Iwase, C. H. T. e Rocha, L. O. (2018). Toxigenic *Alternaria* species: impact in cereals worldwide. *Current Opinion in Food Science*, **23**, 57-63
- Tsang, C. C., Tang, J. Y., Lau, S. K. e Woo, P. C. (2018). Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era—past, present and future. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **16**, 197-210.
- Twarużek, M., Soszczyńska, E., Winiarski, P., Zwierz, A. e Grajewski, J. (2014). The occurrence of molds in patients with chronic sinusitis. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, **271**(5), 1143-1148.
- Uzma, F., Konappa, N. M. e Chowdappa, S. (2016). Diversity and extracellular enzyme activities of fungal endophytes isolated from medicinal plants of Western Ghats, Karnataka. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, **3**(4), 335-342.
- Vacher, G., Niculita-Hirzel, H. e Roger, T. (2015). Immune responses to airborne fungi and non-invasive airway diseases. *In Seminars in Immunopathology*, **37**(2), 83-96.
- Vanittanakom, N., Vanittanakom, P. e Hay, R. J. (2002). Rapid identification of *Penicillium marneffei* by PCR-based detection of specific sequences on the rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**(5), 1739-1742.
- Vanittanakom, N., Cooper, C. R., Fisher, M. C. e Sirisanthana, T. (2006). *Penicillium marneffei* infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. *Clinical Microbiology Reviews*, **19**(1), 95-110.
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T. e Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, **78**, 343-371.
- Wang, Y. G., Cheng, J. M., Ding, H. B., Lin, X., Chen, G. H., Zhou, M. e Ye, S. N. (2018). Study on the Clinical Features and Prognosis of *Penicilliosis marneffei* Without Human Immunodeficiency Virus Infection. *Mycopathologia*, **183**(3), 551-558.

- Warnock, D. W., Hajjeh, R. A. e Lasker, B. A. (2001). Epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. *Current Infectious Disease Reports*, **3**(6), 507-516.
- Weryszko-Chmielewska, E., Kasprzyk, I., Nowak, M., Sulborska, A., Kaczmarek, J., Szymanska, A., Haratym, W., Gilski, M. e Jedryczka, M. (2017). Health hazards related to conidia of *Cladosporium* - biological air pollutants in Poland, central Europe. *Journal of Environmental Sciences*, **65**, 271-281.
- Wong, S. C., Sridhar, S., Ngan, A. H., Chen, J. H., Poon, R. W., Lau, S. K. e Woo, P. C. (2018). Fatal *Talaromyces marneffe* Infection in a Patient with Autoimmune Hepatitis. *Mycopathologia*, **183**(3), 615–618.
- Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M. e Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, **75**, 171-212.
- Woudenberg, J. H. C., Seidl, M. F., Groenewald, J. Z., De Vries, M., Stielow, J. B., Thomma, B. P. H. J. e Crous, P. W. (2015). *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes?. *Studies in Mycology*, **82**, 1-21.
- Xiang, H., Zhang, T., Pang, X., Wei, Y., Liu, H., Zhang, Y., Ma, B. e Yu, L. (2018). Isolation of endophytic fungi from *Dioscorea zingiberensis* CH Wright and application for diosgenin production by solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**(13), 5519-5532.
- Xiang, J., Fu, M., Hong, N., Zhai, L., Xiao, F. e Wang, G. (2017). Characterization of a novel botybirnavirus isolated from a phytopathogenic *Alternaria* fungus. *Archives of Virology*, **162**(12), 3907-3911.
- Xu, Jianping. "Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses." *Current Issues in Molecular Biology*, **8**(2), 75-90.
- Yang, C. L., Wu, X. P., Chen, B., Deng, S. S., Chen, Z. E., Huang, Y. Y. e Jin, S. S. (2017). Comparative analysis of genetic polymorphisms among *Monascus* strains by ISSR and RAPD markers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **97**(2), 636-640.
- Yin, G., Zhang, Y., Pennerman, K. K., Wu, G., Hua, S. S. T., Yu, J., Jurick II, W. M., Guo, A. e Bennett, J. W. (2017). Characterization of Blue Mold *Penicillium* Species Isolated from Stored Fruits Using Multiple Highly Conserved Loci. *Journal of Fungi*, **3**(1), 12.
- Zeng, H., Li, X., Chen, X., Zhang, J., Sun, J., Xie, Z. e Xi, L. (2009). Identification of *Penicillium marneffe* in paraffin-embedded tissue using nested PCR. *Mycopathologia*, **168**(1), 31-35.
- Zhang, J., Huang, X., Zhang, X., Zhu, Y., Liao, K., Ma, J., Wang, G., Guo, Y. e Xie, C. (2017). Coinfection of disseminated *Talaromyces marneffe* and *Mycobacteria kansasii* in a patient with papillary thyroid cancer: A case report. *Medicine*, **96**(52), 9072.
- Ziaee, A., Zia, M. e Goli, M. (2018). Identification of saprophytic and allergenic fungi in indoor and outdoor environments. *Environmental Monitoring and Assessment*, **190**(10), 574.

Zulkifli, N. A. e Zakaria, L. (2017). Morphological and Molecular Diversity of *Aspergillus* From Corn Grain Used as Livestock Feed. *HAYATI Journal of Biosciences*, **24**(1), 26-34.

Anexos

Anexo I: Protocolos utilizados para a extração de DNA

Protocolo fornecido pelo kit Plant/Fungi DNA Isolation Isolation Kit # 26200 (Norgen Biotek Corp.), com algumas modificações:

Preparação do lisado

1. Suspende o material previamente conservado em água destilada num microtubo com água destilada autoclavada;
2. Centrifugou-se a 13 523 g durante 10-15 minutos;
3. Descartou-se o sobrenadante;
4. Adicionou-se 500 µL de *Lysis Buffer L* e um 1 µL RNase A, agitou-se cerca de 20 segundos;
5. Adicionaram-se esferas de sílica à mistura anterior;
6. Colocaram-se os tubos nas placas do *Tissuelyser II* (Qiagen®), durante 1 minuto e 30 segundos e repetiu-se o processo;
7. Colocaram-se em banho-maria a 65° durante 30 minutos e inverteram-se os tubos aos 5, 15 e 25 minutos;
8. Centrifugou-se a 15 871 g, durante 10 minutos;
9. Pipetou-se o sobrenadante para um novo tubo;
10. Adicionaram-se 100 µL de *Binding Buffer I*, misturou-se adequadamente;
11. Incubou-se durante 5 minutos em gelo;
12. Pipetou-se para uma coluna de anel branco, com um tubo coletor e centrifugou-se a 15 871 g, durante 2 minutos;
13. Transferiu-se o volume do filtrado para um novo tubo, mediu-se esse volume e adicionou-se o mesmo volume de etanol a 70% e misturou-se adequadamente;

Ligação à coluna

14. Pipetou-se até 650 µL da mistura anterior para a coluna de anel cinzento e centrifugou-se a 9 391 g, durante 1 minuto;
15. Descartou-se o filtrado e repetiu-se o processo, reutilizando o tubo coletor;

Lavagem

16. Adicionaram-se 500 μ L de *Buffer WN* na coluna e centrifugou-se a 9 391 g, durante 1 minuto;
17. Descartou-se o filtrado, adicionaram-se 500 μ L de *Wash Solution Buffer A* e centrifugou-se a 9 391 g, durante 1 minuto;
18. Descartou-se o filtrado e repetiu-se o passo anterior;
19. Descartou-se o filtrado e centrifugou-se a 15 871 g, durante 2 minutos;
20. Colocou-se a coluna num microtubo e descartou-se o tubo coletor com o filtrado;

Eluição

21. Adicionaram-se 100 μ L de *Elution Buffer B* a 65° C e incubou-se a 1 minuto à temperatura ambiente;
22. Centrifugou-se a 9 391 g, durante 1 minuto;
23. Adicionou-se 50 μ L de *Elution Buffer B* a 65° C e incubou-se 1 minuto à temperatura ambiente;
24. Centrifugou-se a 9 391 g, durante 1 minuto.

Protocolo pelo método de CTAB:

Preparou-se o tampão de extração:

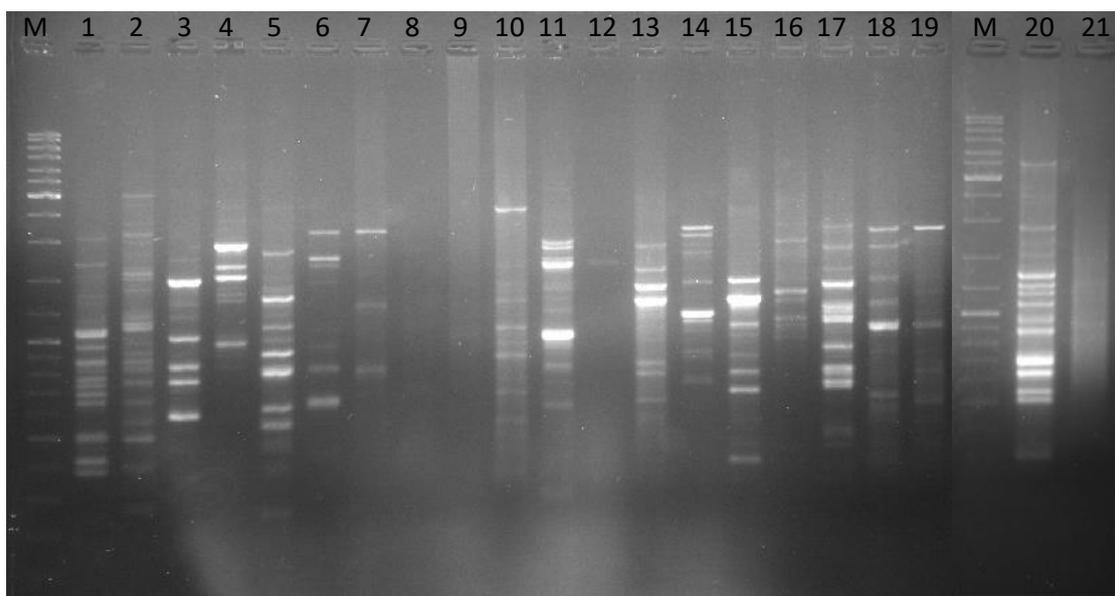
- Solução CTAB (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA pH8, 10 mM Tris-HCL pH8)
(Applichem Panreac®)
 - 2% PVP (polyvinylpyrrolidone) (Sigma-aldrich®)
 - 1% β -mecaptoethanoL (Applichem®)
1. Centrifugou-se 13 523 g, durante 15 minutos;
 2. Descartou-se o sobrenadante;
 3. Adicionaram-se 1 000 μ L do tampão de extração a 65° C;
 4. Adicionaram-se 3 μ L de *proteinamark*;

5. Adicionaram-se esferas de marcação;
6. Macerou-se no *Tissuelyser II* (Qiagen®), durante 1 minuto e 30 segundos e repetiu-se o processo;
7. Colocou-se em banho-maria a 65°C durante 4 horas e foi se agitando;
8. Colocar 5 minutos no gelo;
9. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo;
10. Adicionaram-se 1 000 µL de CIA (clorofórmio + isomialcool);
11. Agitou-se manualmente;
12. Centrifugou-se 16 363 g, durante 20 minutos;
13. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo de 2 ml;
14. Repetiu-se quando necessário;
15. Adicionaram-se 1 µL de *RNase*;
16. Colocou-se em banho-maria a 37°C, durante 20 minutos;
17. Adicionaram-se 750 µL *isopropanol* a -20°C;
18. Inverteu-se manualmente durante cerca de 10 a 15 minutos;
19. Colocou-se “overnight” a -20° C;
20. Centrifugou-se 18 407 g, durante 30 minutos;
21. Removeu-se o sobrenadante (*pellet* “oculto”);
22. Adicionaram-se 500 µL de tampão de lavagem a -20° C;
23. Agitou-se durante 2 minutos e colocar 8 minutos a -20 ° C;
24. Centrifugou-se 9 391 g, durante 30 minutos;
25. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar o *pellet*, cerca de 3 horas;
26. Adicionaram-se 100 µL de *TE*;
27. Colocou-se no banho-maria a 37° C, durante 2 horas;
28. Colocou-se “overnight” a 4° C.

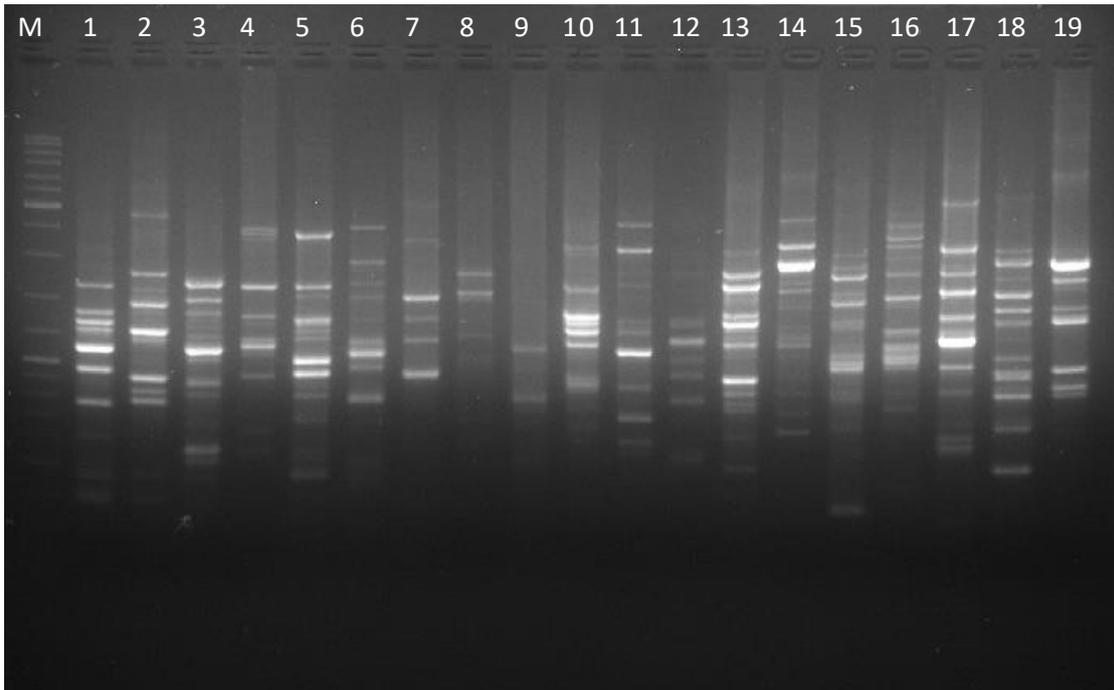
Anexo II: Sequência dos “primers” de ISSRs testados durante a seleção de marcadores moleculares e Géis obtidos.

	“Primers”	Sequência
1	UBC807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
2	UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
3	UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
4	UBC811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
5	UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
6	UBC815	CTC TCT CTC TCT CTC TG
7	UBC817	CAC ACA CAC ACA CAC AA
8	UBC818	CAC ACA CAC ACA CAC AG
9	UBC820	GTG TGT GTG TGT GTG TC
10	UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG
11	UBC835	AGA GAG AGA GAG AGA
12	UBC843	CTC TCT CTC TCT CTC TRA
13	UBC864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
14	UBC873	GAC AGA CAG ACA GAC A
15	UBC880	GGA GAG GAG AGG AGA
16	UBC881	GGG TGG GGT GGG GTG
17	UBC886	VDV CTC TCT CTC TCT CT
18	UBC888	BDB CAC ACA CAC ACA CA
19	UBC889	DBD ACA CAC ACA CAC AC
20	UBC890	VHV GTG TGT GTG TGT GT
21	UBC896	AGG TCG CGG CCG CNN NNN NAT G

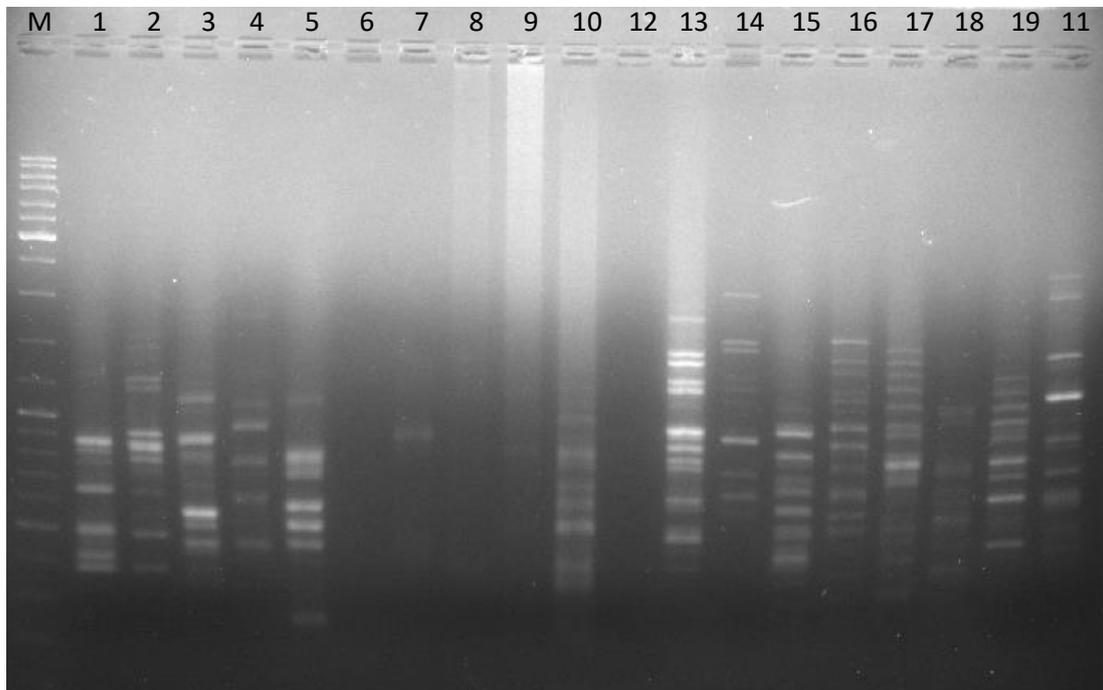
Gel do teste de “primers” do género *Cladosporium*:



Gel do teste de “primers” do género *Penicillium*:



Gel do teste de “primers” do género *Aspergillus*:



Anexo III – Resumo da Jornadas de Ciência e Cidadania - 11as Jornadas de Biologia

Resultados preliminares de um estudo do papel das flores como vetores para a infeção fúngica

D Martins^{1*}, AS Soares², R Ferreira¹, T Ferreira³, F Fraga⁴, C Miranda², M Matos^{5,6}, AC Coelho^{4,7}

1 Aluno do Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde da Escola de Ciências da Vida e do Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal

2 Centre for the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences (CITAB), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, UTAD, Portugal

3 Aluna da licenciatura em Bioquímica da Escola de Ciências da Vida e do Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal

4 Departamento de Ciências Veterinárias, Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal

5 Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

6 BkioISI – Biosystems & Integrative Sciences Institute, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

7 The Animal and Veterinary Research Centre (CECAV), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal

Estudo do papel das flores como vetores para a infeção fúngica

D Martins^{1*}, AS Soares², R Ferreira¹, T Ferreira³, F Fraga⁴, C Miranda², M Matos^{5,6}, AC Coelho^{4,7}

¹ Aluno do Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde da Escola de Ciências da Vida e do Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal

² Centre for the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences (CITAB), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, UTAD, Portugal

³ Aluna da licenciatura em Bioquímica da Escola de Ciências da Vida e do Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal

⁴ Departamento de Ciências Veterinárias, Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal

⁵ Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

⁶ BkioISI – Biosystems & Integrative Sciences Institute, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

⁷ The Animal and Veterinary Research Centre (CECAV), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal

Keywords: Flores; Fungos Filamentosos; Saúde Pública

As flores são uma fonte de microrganismos como fungos, podendo ser vistas como um reservatório de agentes patogénicos. O ato de oferecer flores está associado a diversas situações do quotidiano, sendo frequentemente oferecidas a indivíduos doentes, podendo constituir um risco na disseminação de agentes infecciosos. Devido a este facto, as flores têm sido proibidas nos hospitais, principalmente em unidades com alto risco de infeção, como quartos de doentes com imunodeficiência e cuidados intensivos.

Neste sentido, realizou-se um rastreio de fungos filamentosos em 86 flores de diferentes espécies: rosas (32), petúnias (22), lychnis (11), crisântemo (10), camélias (7), dalias (2) e azáleas (2). Obtiveram-se 167 isolados fúngicos diferentes, dos quais 84 (50,3%) pertenciam ao género *Cladosporium*, 50 (30%) pertenciam ao género *Penicillium*, 25 (15%) ao género *Alternaria* e 8 (4,7%) à espécie *Aspergillus*. Neste estudo, em rosas, petúnias e lychnis foram isolados os géneros fúngicos *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Aspergillus*, em dalias e crisântemos, foram isolados os géneros *Cladosporium*, *Penicillium* e *Alternaria*, em camélias foram isolados os géneros *Cladosporium* e *Penicillium* e em azáleas foi isolado o género *Cladosporium*. Também foi observado uma grande diversidade nos fungos isolados.

Estes resultados sugerem que as flores podem ser importantes reservatórios de fungos filamentosos implicados em infeções fúngicas e justifica a proibição da entrada de flores em ambientes hospitalares, bem como o uso de flores dentro de casas onde habitem pessoas imunodeprimidas.