

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CAMPUS SÃO GABRIEL

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**

GRACIÉLE CUNHA ALVES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FUNGO FIMA 665-5, ISOLADO DO
MUSGO *Sanionia uncinata* (HEDW.) LOESKE, ILHA REI GEORGE, ANTÁRTICA**

SÃO GABRIEL, RIO GRANDE DO SUL,

2014

GRACIÉLE CUNHA ALVES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FUNGO FIMA 665-5, ISOLADO DO
MUSGO *Sanionia uncinata* (HEDW.) LOESKE, ILHA REI GEORGE, ANTÁRTICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Batista Pereira

Co-orientador: Prof.^a Dra. Margéli Pereira Albuquerque

São Gabriel,

2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do

Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

A731i Alves, Graciéle Cunha

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FUNGO
FIMA 665-5, ISOLADO DO MUSGO *Sanionia uncinata*
(HEDW.) LOESKE, ILHA REI GEORGE, ANTÁRTICA /
Graciéle Cunha Alves.

55 p.

Dissertação(Mestrado)-Universidade Federal do Pampa,
Campus São Gabriel, MESTRADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS, 19/12/2014.

"Orientação: Prof. Dr. Antonio Batista Pereira".

1. Micologia. 2. Ecologia. 3. Taxonomia.

GRACIÉLE CUNHA ALVES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FUNGO FIMA 665-5, ISOLADO DO
MUSGO *Sanionia uncinata* (HEDW.) LOESKE, ILHA REI GEORGE, ANTÁRTICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Ciências Biológicas

Linha de Pesquisa: Ecologia e Sistemática

Dissertação defendida e aprovada em: 19/12/2014.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antonio Batista Pereira
Orientador
UNIPAMPA-São Gabriel

Prof.^a Dr.^a Marisa Terezinha Lopes Putzke
UNISC-Santa Cruz do Sul

Prof. Dr. Jair Putzke
UNISC-Santa Cruz do Sul

Prof. Dr. Igor Poletto
UNIPAMPA-São Gabriel

A minha mãe Regina, por ser fonte inesgotável de amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Regina Helena Alves e Gilbrando Alves, pelo amor, carinho, por estarem sempre me apoiando, me incentivando nas horas difíceis e por me proporcionarem chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Antônio Batista Pereira pela orientação, confiança em mim depositada, pelo suporte e ajuda para a realização deste trabalho, foi fundamental.

Agradeço especialmente a minha querida co-orientadora Prof.^a Dra. Margéli Pereira Albuquerque, pela qual tenho grande admiração pela profissional e pessoa que é. Agradeço pela dedicação disponibilizada ao longo deste trabalho, pela ajuda, afetividade, pelos ensinamentos, pela paciência e principalmente pela confiança em mim depositada.

Ao meu esposo Thiago, pela compreensão, incentivo, amor, carinho, amizade e paciência ao longo desta jornada!

Ao prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria, pela disponibilidade, paciência, auxílio e confiança depositada, que foram fundamentais para realização deste trabalho.

Aos técnicos da Unipampa, que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho, em especial ao técnico Adriano pela atenção e disponibilidade em ajudar.

Aos colegas de laboratório do Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica (NEVA), pela ajuda direta ou indireta.

Ao acadêmico do curso de Ciências Biológicas Rodrigo Alves, pela amizade que se iniciou ao decorrer do mestrado, pela ajuda não só profissional como pelo apoio nas horas tensas.

A todos os professores que contribuíram ao longo das disciplinas cursadas.

À Universidade Federal do Pampa que permitiu a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais (INCT-APA) pelo suporte financeiro ao projeto.

Por muitas vezes o mestrado mostrou-se um sonho distante, mas com persistência consegui realizá-lo. A todos vocês e aqueles que não foram citados, mas que contribuíram de alguma forma e me permitiram sonhar e continuar sonhando, obrigada!

“Persistência é a teimosia com um propósito.”

Richard Devos

RESUMO

Os fungos na Antártica ocupam nichos distintos e realizam diferentes interações, porém sua importância nestes nichos e interações ainda são pouco compreendidas. Interações entre fungos e musgos vêm sendo relatadas para a Antártica, um exemplo dessa interação fungo-musgo é a presença de fungos formadores de anéis sobre carpetes de musgos antárticos. Estes fungos formadores de sistemas de anéis concêntricos podem causar necroses e manchas amarelas e marrons sobre os carpetes de musgos. Contudo, devido à complexidade destes fungos, as informações sobre estes são fragmentadas não existindo ainda uma caracterização completa destes organismos. Assim, este estudo buscou identificar o isolado nomeado FIMA 665-5, encontrado em amostras do musgo *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loesk. Além disso, caracterizar fisiológica, bioquimicamente e testar a presença de atividade patogênica do isolado. As coletas do material para o estudo foram realizadas na Expedição Antártica Brasileira no verão austral de 2012/2013. Para a caracterização fisiológica do isolado foram testados diferentes meios de cultura (BDA, Sabouraud e MEA) e diferentes temperaturas (-6°C, 1°C, 5°C, 10°C, 20°C e 30°C), onde a velocidade de crescimento do isolado foi medida com o auxílio de um paquímetro a cada 24h, até que o crescimento de uma das colônias atingisse a borda da placa. Os resultados foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software Statistix 8. Para a caracterização bioquímica foram realizados ensaios enzimáticos para verificar a produção de pectinase, celulase, protease e amilase nas temperaturas de 10°C e 30°C. Para avaliar a atividade patogênica, foram realizados testes de patogenicidade química a partir do extrato obtido do isolado, bem como teste de confronto por disco em difusão. Através de métodos moleculares e filogenéticos o isolado foi identificado como pertencente ao gênero *Penicillium* Link, sendo um organismo psicrotrófico, com crescimento entre 1-30°C, tendo um crescimento micelial ótimo a 20°C. O meio de cultura onde ocorre às condições nutricionais mais favoráveis para o crescimento micelial do isolado é o meio BDA. No que se refere à patogenicidade, o isolado apresentou capacidade de inibir o crescimento *in vitro* e causar descoloração total nos gametófitos do musgo *Physcomitrium acutifolium* Broth.

Palavras - chave: Patogenicidade, *Penicillium*, fungos formadores de anéis, Antártica.

ABSTRACT

Fungi in Antarctica occupy different niches and perform different interactions, but its importance in these niches and interactions are still poorly understood. Interactions between fungi and mosses have been reported to Antarctica an example of these interactions is the presence of fungi forming rings on of carpets Antarctic mosses. These fungi forming rings can cause necrosis and yellow to brown stains on the carpets of mosses. However, due to the complexity of these fungi information about these are fragmented and there is still no complete characterization of these organisms. This study aimed to identify the isolated named FIMA 665-5, found in samples of moss *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loesk. Further, characterize physiological, biochemical and test the presence of pathogenic activity of isolated. The collections of the material for the study were performed at the Brazilian Antarctic Expedition in the austral summer of 2012/2013. Through taxonomic, molecular and phylogenetic methods the isolate was identified belonging to the genus *Penicillium* Link (1809). For physiological characterization of different culture media (PDA, MEA and Sabouraud) and different temperatures (-6°C, 1°C, 5°C, 10°C, 20°C and 30°C) were tested where the diameter colony was measured with a caliper every 24h, until the growth of a colony reached the edge of the plate. The results were submitted to ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$) using the Statistix 8. For the biochemical characterization were performed enzymatic assays with different culture media to verify the production of enzymes such as pectinase, cellulase, protease and amylase at temperatures of 10°C and 30°C. To evaluate the pathogenic activity chemical pathogenicity tests were performed obtained from the isolated extract and by confronting disk diffusion test. Through taxonomic methods, molecular and phylogenetic isolated was identified belonging to the genus *Penicillium* Link, one psychrotrophs organism, with growth between 1-30°C, with a great mycelial growth at 20°C. The culture medium which has more favorable nutritional conditions for mycelial growth of isolate is PDA medium. Regarding to pathogenicity, the isolate showed ability to inhibit the in vitro growth and cause complete discoloration in the gametophytes of moss *Physcomitrium acutifolium* Broth.

Key - words: Pathogenicity, *Penicillium*, fungi forming rings, Antarctica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia dos sistemas de anéis concêntricos formados pelo fungo FIMA 665-5, sob carpetes do musgo <i>S. uncinata</i>	20
Figura 2 - Fotografia do método de difusão em disco modificado	32
Figura 3 - Gráfico do crescimento micelial do isolado FIMA 665-5 em diferentes tratamentos	33
Figura 4 - Fotografia da cultura e hifas do isolado FIMA 665-5	34
Figura 5 - Fotografia da colônia do isolado FIMA 665-5 na temperatura de 30°C	35
Figura 6 - Fotografia dos clamidósporos intercalares do isolado FIMA 665-5	35
Figura 7 - Fotografia dos núcleos do isolado 665-5	35
Figura 8 - Árvore filogenética	37
Figura 9 - Fotografia dos testes enzimáticos do isolado FIMA 665-5	38
Figura 10 - Fotografia do teste de patogenicidade química.....	39
Figura 11 - Fotografia do teste de confronto.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação do crescimento micelial do isolado FIMA 666-5 em diferentes meios de cultura.....	33
Tabela 2 - Sintomas apresentados pelos gametófitos por tempo de incubação.....	39

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação contempla um capítulo, referente a um manuscrito. O capítulo contém uma breve revisão bibliográfica, os objetivos, o manuscrito, a conclusão e as considerações finais.

A metodologia realizada e os resultados obtidos nesta dissertação são apresentados no item manuscrito, pois no mesmo constam as seções: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas.

As referências referem-se somente às citações que aparecem nos itens da revisão bibliográfica desta dissertação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Antártica	15
1.2 Caracterização da Área de Estudo	17
1.3 Flora Antártica	17
1.4 Patogenicidade fúngica	18
1.5 Gênero <i>Penicillium</i> Link	20
1.6 Musgo <i>Sanionia uncinata</i> (Hedw.) Loeske	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3. MANUSCRITO	25
4. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

CAPÍTULO I

Caracterização morfofisiológica, enzimática e atividade patogênica do isolado FIMA 665-5, encontrado sobre o musgo *Sanionia Uncinata* (Hedw.) Loeske, coletado na Ilha Rei George, Antártica

1 INTRODUÇÃO

1.1 Antártica

O continente Antártico surgiu da separação do supercontinente Gondwana, sendo resultado da movimentação das placas tectônicas no período do Cretáceo a 120 milhões de anos atrás e se tornou mais isolado através do tempo. A Antártica separou-se totalmente da América do Sul há 33.700 milhões de anos e deslocou-se até a posição onde se encontra hoje (CLARK *et al.*, 2004; VIEIRA, 2006).

A Antártica foi o último continente conhecido pelo homem, sendo descoberta em 1599. Na década de cinquenta, houve um crescente interesse científico na Antártica por cientistas do mundo inteiro que estavam despertando para o grande potencial da Antártica no estudo das mais diversas áreas da ciência, com foco no cenário das mudanças climáticas, o que mudou a percepção deste continente (OCHYRA *et al.*, 1998; 2008; PROANTAR, 2001). No final desta mesma década, a comunidade científica mundial propôs a realização de um esforço internacional para explorar tanto o espaço como a Antártica. Este esforço ficou conhecido como o Ano Geofísico Internacional (IGY). O sucesso do IGY motivou a realização de uma reunião para discutir o futuro da ciência antártica em 1958. Após um período de discussões, doze nações (África do Sul, Argentina, Austrália, Bélgica, Chile, Estados Unidos da América, França, Japão, Nova Zelândia, Noruega, Reino Unido e Rússia) chegaram a um acordo e assinaram o Tratado da Antártica, em 1959. Neste tratado, a Antártica foi definida geopoliticamente como todas as terras à área ao sul da latitude 60°S, incluindo todas as plataformas de gelo. Os membros do tratado descrevem a Antártica como uma reserva natural, dedicada à paz e a ciência, e este entrou em vigor em junho de 1961. O Brasil, através da sua contribuição efetiva no desenvolvimento da pesquisa científica na Antártica foi admitido como Membro Consultivo do Tratado da Antártica em 1983 (PROANTAR, 2001).

O continente Antártico trata-se de um dos habitats mais inóspitos do mundo principalmente para as plantas, pois possui o clima mais frio e com o maior índice de ventos fortes do planeta, com médias anuais de precipitação entre 30 e 70 mm (OCHYRA *et al.*, 2008). A temperatura mínima registrada foi de -89,6 °C na Base científica de Vostok, em julho de 1983 (PHILLPOT, 1985). Entretanto, a Península Antártica localizada no Hemisfério Ocidental possui o clima mais suave da Antártica, por apresentar maior umidade,

temperaturas mais amenas e ventos mais fracos, o que possibilitou o desenvolvimento de espécies vegetais (OCHYRA *et al.*, 2008).

Entender o ecossistema antártico é importante, pois através de estudos, nos fornece informações-chave sobre os sistemas globais, tais como, as estimativas do aquecimento global, o magnetismo da Terra, a eletricidade atmosférica, as placas tectônicas e as correntes oceânicas. Muitos dos componentes da Antártica, nestes sistemas globais, estão em equilíbrio sensível e, portanto, são úteis para monitorar as alterações ambientais (BENNINGHOFF, 1987). KENNEDY (1995) sugere que comunidades vegetais antárticas podem ser particularmente vulneráveis a mudanças globais, as quais incluem suas taxas de desenvolvimento e respostas restritas ao fluxo gênico às novas condições. Contudo, esta vulnerabilidade deve ser definida no que diz respeito à direção e taxas de mudança, e é provável que algumas perturbações possam aumentar a complexidade e produtividade da biota com feedback negativo para o ciclo global do carbono. O autor ainda salienta que as perturbações ambientais, como qualquer aumento da temperatura ambiente, disponibilidade de água, ou regime de luz, vão incentivar o desenvolvimento de novas associações com efeitos concomitantes sobre o funcionamento do ecossistema. Sendo que, o clima é fator preponderante nos ecossistemas terrestres da Antártica Marítima, determinando as características e propriedades dos ambientes presentes nas áreas livres de gelo. O constante recuo das geleiras está expondo áreas antes cobertas por gelo, modificando a paisagem e conseqüentemente, o microclima e a biota (SETZER *et al.*, 2004). Mais recentemente, um estudo realizado na Península Antártica Ocidental por Bers *et al.*(2013) mostra mudanças bruscas na temperatura da superfície do mar, salinidade, partículas em suspensão no mar e clorofila *a* nos últimos 20 anos e que essas mudanças podem estar diretamente relacionadas aos ciclos climáticos.

Com todas essas mudanças que a Antártica vem sofrendo ao longo das décadas, as associações ecológicas podem entrar em desequilíbrio, através do aumento do número de competidores, como por exemplo, espécies exóticas e, assim, causar mudanças nas comunidades locais. Com isso, é importante entender as relações ecológicas que ocorrem na Antártica, a fim de relacioná-las com os fatores abióticos que interferem no funcionamento do ecossistema antártico.

1.2 Caracterização da área de estudo

Ao noroeste da Península Antártica localiza-se o arquipélago das Shetland do Sul. As maiores ilhas deste arquipélago são Elefante, Rei George, Nelson, Robert, Greenwich, Livingston e Deception. A Ilha Rei George é a maior ilha no arquipélago, com 64.8 Km de comprimento e 40 Km de largura (MARSZ, 2000; OLECH, 2004) e situa-se em nas coordenadas 61°50' - 62°15'S e 57°30' - 59° 00'W, da Península Antártica (FERRON *et al.*, 2001). As temperaturas na ilha oscilam em torno de 0°C durante todo o ano, com ventos fortes e alta umidade do ar devido à água do mar circundante que afeta significativamente o clima na ilha. As condições climáticas na região são também influenciadas pelo fato de que a maior parte da ilha (mais de 90%) é coberta por gelo (OLECH, 2004).

A Ilha Rei George está submetida a um clima marítimo, caracterizado pela sucessão frequente de centros de baixa pressão. A atividade ciclônica é alta no verão, como consequência da migração dos centros de baixa pressão ao norte do Círculo Polar Antártico (BRAUN, 2001). Diferente da condição desértica polar do continente Antártico, a Ilha Rei George apresenta precipitação anual em torno de 366 mm, bem distribuída ao longo do ano, sendo um pouco mais concentrada nos meses de março e abril, em que se verifica maior precipitação de água líquida (SCHAEFER, 2004).

1.3 Flora Antártica

A Antártica é o único bioma cuja biota terrestre compreende quase que exclusivamente de criptógamas (microorganismos, fungos, fungos liquenizados, algas, musgos e invertebrados terrestres) (OCHYRA *et al.*, 2008). Os líquens, fungos e briófitas são as formas dominantes, sendo as Angiospermas muito escassas (Kappen & Schoroeter, 1997). Ainda que a predominância seja de organismos pequenos, a Antártica possui uma notável flora terrestre, que é representada por apenas duas espécies de Angiospermas, *Deschampsia antarctica* Desv., pertencente à família *Poaceae* (Barnhart), e *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., pertencente à família *Caryophyllaceae* (Juss.) Rabeler & Bittrich. As Bryophytas estão representadas por 22 espécies de *Hepaticae* (Bruch & Schimp) (PUTZKE & PEREIRA, 2001) e 111 espécies de musgos, (OCHYRA, *et al.*, 2008). As algas macroscópicas terrestres são basicamente duas espécies: *Prasiola crispa* (Lightfoot) Menegh. e *Prasiola cladophylla* (Carmich.) Menegh e a alga liquenizada *Mastodea tessellata* J. D. Hooker & Harvey. Os fungos liquenizados, reúnem 386 espécies conhecidas em toda Antártica (ØVSTEDAL &

LEWIS-SMITH, 2001) e pouco mais 1.000 nomes de fungos não liquenizados foram notificados para a Antártica e região Sub-Antártica, dentre estes se incluem representantes dos principais grupos de fungos (Ascomycetes, Basidiomicetes, Zigomycetes, Chytridiomycetes, Oomycetes e Glomeromycota) (BRIDGE *et al.*, 2008).

1.4 Patogenicidade fúngica

Os fungos têm sido encontrados crescendo sobre briófitas, como seus patógenos, parasitas, sapróbios, endófitos e comensais (DAVEY & CURRAH, 2006; PTASZYŃSKA *et al.*, 2009). Fungos patógenos de musgos vêm sendo notificados no mundo, desde meados do século XIX e desempenham papéis importantes na ciclagem de nutrientes, dinâmica populacional e pequenas perturbações que alteram a composição da comunidade em ecossistemas dominados por briófitas (DAVEY & CURRAH, 2006; DAVEY *et al.*, 2009; RACOVITZA, 1959). Apesar dos musgos não consistirem "pontos quentes" para fungos patógenos, como as plantas vasculares que possuem estruturas de armazenamento ricas em nutrientes, ou tecidos especializados de transporte, ricos em produtos fotossintéticos, a patogênese fúngica de musgos, vem sendo relatada com uma frequência cada vez maior (DAVEY & CURRAH, 2006). Os fungos podem infectar as estruturas das briófitas, tais como o protonema, talo, rizóides, filídios, células, organelas ou fragmentos especiais da parte superior, intermediária ou inferior da planta. Sendo que, os mecanismos de penetração na célula hospedeira, perturbação, etiologia, disseminação da doença e resposta do hospedeiro à infecção podem variar nos indivíduos. Patógenos fúngicos de briófitas também podem ser detectados pela necrose macroscópica de coloração preta, castanha ou amarela e manchas cloróticas que causam em gametófitos de musgos anteriormente saudáveis (DAVEY & CURRAH, 2006; DÖBBELER, 2002).

Existem vários relatos que indicam interações entre fungos e criptógamas na Antártica (NEWSHAM & BRIDGE, 2010; PEGLER *et al.*, 1980; UPSON *et al.*, 2007; WILLIAMS *et al.*, 1994). Wilson (1951) e Longton (1973) relataram fungos formadores de anéis concêntricos de até 20 cm, encontrados em regiões polares. Fenton (1983) descreveu fungos na Antártica Marítima com sistema de anéis concêntricos de até 5 m de diâmetro observados sobre turfas do musgo *Chorisodontium aciphyllum* (Hook. f. & Wils.) Broth. e ocasionalmente em 3 tapetes dos musgos hidrófilos como *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loesk e *Calliergidium austrostramineum* (Müll. Hal.) E.B. Bartram. Tojo *et al.* (2012) encontraram na Ilha Rei George uma espécie de Oomycete o *Pythium polare* Tojo van West & Hoshino,

que infecta caulídios e filídios do musgo *Sanionia uncinata* causando descoloração marrom nos gametófitos.

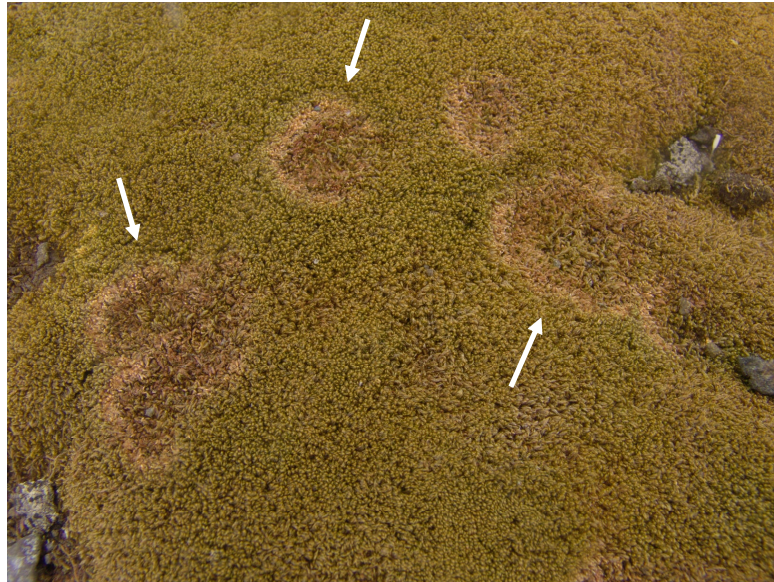
De acordo com Bridge & Spooner (2012) entender o estilo de vida de fungos mutualistas, sapróbios, parasitas e patogênicos é fundamental para a compreensão de suas funções ecológicas. Ptasińska (2009) sugere que micologistas despertem seu interesse nas briófitas, pois estas são uma fonte potencial e rica em espécies de fungos ainda não descritas.

Nas últimas décadas, as regiões antárticas têm sido investigadas principalmente pela presença de bactérias psicrófilas e *Archea* para exploração biotecnológica, ocasionalmente as algas e, mais raramente, os fungos (RUISI *et al.*, 2007; TOSI *et al.*, 2002). Os cientistas aprofundaram seus estudos sobre organismos e microorganismos extremófilos, os quais são encontrados vivendo em locais onde a maioria dos seres vivos não sobreviveria, como por exemplo, em temperaturas extremas (-20°C/300°C). Como resultado destas pesquisas, pode-se citar os estudos sobre proteínas anticongelantes (SNIDER *et al.*, 2000) e lipases anticongelantes (MOHAMMED *et al.*, 2013) encontradas em fungos. Em ambientes com temperaturas baixas, sendo este termo normalmente entendido em Biologia como temperaturas abaixo de zero e com o limite inferior de -70°C (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004). O continente Antártico oferece uma gama de condições climáticas extremas e, portanto, é uma região mais adequada para a pesquisa de organismos adaptados a baixas temperaturas.

Em termos ambientais, as interações ecológicas estabelecidas entre fungos e outros organismos é essencial para a manutenção de um ecossistema em equilíbrio. No entanto, a maioria dos trabalhos relacionados aos fungos muscícolas na Antártica Marítima são pontuais, existindo até o presente momento, apenas informações fragmentadas, sem uma descrição completa do ciclo de vida, interações e as caracterizações morfológica, fisiológica e bioquímica desses organismos. Essa carência de informações é resultado da alta complexidade do grupo em questão, bem como da baixa frequência com a qual o grupo é estudado. Com isso, este estudo teve como principal objetivo estudar a biologia do fungo formador de anéis concêntricos (FIGURA 1), associado ao musgo *Sanionia uncinata*, encontrado na Ilha Rei George, região de Arctowski, Antártica; através da caracterização morfológica, fisiológica, molecular e bioquímica do isolado obtido a partir das amostras coletadas, e assim, relacionar sua capacidade de desenvolvimento em diferentes temperaturas, determinando sua relevância enquanto patógeno de musgos e indicadores de impactos ambientais. Pois, de acordo Bridge & Spooner (2012), fungos terrestres realizam funções

vitais na ciclagem de nutrientes no solo, e as mudanças nos padrões de doenças em plantas são muitas vezes os primeiros sinais de mudança ambiental.

Figura 1 - Fotografia do sistema de anéis concêntricos formados pelo fungo em estudo, sob carpetes do musgo *S. uncinata*.



Fonte: Filipe de Carvalho Victoria, 2012.

1.5 Gênero *Penicillium* Link

Penicillium Link é um gênero anamorfo que foi descrito em 1809 e pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota Caval-Sm, classe Eurotiomycetes O. E. Erikss. & Winka, sub-classe Eurotiomycetidae Tehler, ordem Eurotiales G.W. Martin ex Benny & Kimbr. e família Trichocomaceae E. Fisch. É caracterizado por apresentar conídios pequenos, leves e estáticos que permitem a fixação em quase todas as superfícies e ambiente ao entorno (PITT, 1979; MOREY *et al.*, 2003; AMIRI *et al.*, 2005). Atualmente o gênero possui 13 sinônimas (INDEX FUNGORUM, 2014). Este gênero é de taxonomia bastante complexa e a dificuldade na sua taxonomia e identificação está ligada a variabilidade do gênero. Cerca de 70 a 80% das estirpes são identificadas morfolologicamente com bastante confiança, no entanto, a outra parte das linhagens são extremamente difíceis de identificar (PITT, 1988). E o sequenciamento de linhagens permite novas investigações sobre o parentesco de organismos através de estudos filogenéticos e uma única base alterada dentro da sequência de DNA pode representar variação intraespecífica e numerosos estudos têm sido realizados para resolver questões em torno de espécies de *Penicillium* (PETERSON, 2000).

Com base no estudo de Godinho *et al.* (2013) o gênero *Penicillium* é mesófilo, psicrotolerante e possui adaptação ao clima antártico. O gênero é cosmopolita, encontrado em quase todos os lugares dos trópicos aos pólos, estão presentes no solo, no ar, na vegetação em deterioração e em associação com vegetais e animais (DOMSCH *et al.*, 1993; MCRAE & SEPPELT, 1999; PITT, 2000). O grupo atualmente contém 354 espécies aceitas (VISAGIE, *et al.*, 2014) e espécies do gênero vem sendo reportadas ocorrendo para regiões da Península Antártica e do Continente Antártico (MCRAE & SEPPELT, 1999). De acordo com Godinho *et al.* (2013) *Penicillium* é o taxa mais frequente de fungos, que ocorrem associados à macroalgas endêmicas e adaptadas ao frio da Antártica. Segundo o checklist realizado por Bridge *et al.* (2008) e atualizado em 2010 (versão online), existem 53 espécies descritas de *Penicillium* para a Antártica dentre estas as espécies *Penicillium brevicompactum* Dierckx, *P. glabrum* Westling, *P. simplicissimum* Thom, (Möller & Dreyfuss, 1996), *P. minioluteum* Dierckx (TOSI *et al.* 2002) e *P. solitum* var. *solitum* Westling (McRae & Seppelt, 1999) vem sendo reportadas associadas a espécies de musgos como *Campylopus pyriformis* (Schultz) Brid. e *Bryum pseudotriquetrum* (Hedw.) G. Gaertn., B. Mey & Scherb.

As espécies do gênero *Penicillium* são importantes decompositores e recicladores de matéria orgânica de todos os tipos (MCRAE & SEPPELT, 1999; PITT, 1979), são consideradas muito importantes na indústria alimentícia, pois espécies do gênero estão entre os principais agentes patogênicos de frutas (FALLIK *et al.*, 1996; PITT, 2000; PRUSKY *et al.*, 2004), dentre as doenças em frutas pode-se citar o “mofo azul”, que é uma podridão mole causada por várias espécies de *Penicillium* incluindo *P. expansum*, a mais agressiva e a mais comumente relatada (PIANZZOLA, *et al.*, 2004). Ainda, algumas espécies do gênero causam infecções oportunistas em humanos (DUONG, 1996). As espécies de *Penicillium* vêm sendo estudadas quanto ao seu potencial biotecnológico. O gênero ganhou destaque em estudos a partir de 1929, com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, abrindo novos caminhos e investimentos científicos no domínio da antibioterapia e conseqüentemente à descoberta de novos antibióticos (PEREIRA & PITA, 2005).

Algumas espécies de *Penicillium* produzem metabólitos secundários bioativos, que podem servir como antimicrobianos (NANDA & AKILA, 2014), outras podem produzir enzimas frio-ativas, que são de interesse significativo como biocatalisadores em processos industriais (MOHAMMED *et al.*, 2013). Ainda dentre as utilizações biotecnológicas do gênero, pode-se citar biocontrole, parasitismo e produção de fármacos a partir de seus metabólitos secundários (MONTEIRO, 2012). Porém, várias espécies de *Penicillium* produzem metabólitos secundários tóxicos, chamados micotoxinas (FOG NIELSEN, 2003;

RUNDBERGET & WILKINS, 2002; RUNDBERGET *et al.*, 2004) onde a importância destes compostos podem variar, devido aos fatores ecológicos e biológicos de cada espécie (PITT, 2000).

O gênero *Penicillium* possui importâncias nas mais diversas áreas da indústria biotecnológica, farmacêutica e alimentícia, além de sua importância ecológica, como recicladores de matéria orgânica e fazendo a degradação de produtos e compostos. Essa característica do grupo de produzir micotoxinas, que podem atuar como antifúngicas, antitripanossoma e contaminante alimentar, podem estar relacionadas com a capacidade de este isolado ser um agente patogênico de musgos na Antártica.

1.6 *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske

Sanionia uncinata é uma espécie de musgo alpino polar, que está distribuída sobre uma grande área da Antártica (OCHYRA, 1998), sendo o musgo mais abundante na Ilha Rei George (NAKATSUBO, 2002). Ocorre em uma grande variedade de habitats, superfícies rochosas expostas, locais úmidos próximos a córregos (NAKATSUBO & OHTANI, 1992), substratos ricos em matéria orgânica, nas praias e terraços marítimos, preferencialmente próximos a colônias de aves (PUTZKE & PEREIRA, 2001). Também é encontrada ocorrendo em todo o continente Europeu, sendo mais comum ao Norte. Fora da Europa *S. uncinata* é generalizada no Norte temperado para zonas Árticas e em altitudes elevadas de ambas as regiões tropicais e subtropicais (HEDENÄS, 2003).

O musgo *S. uncinata* vem sendo estudado devido a sua importância ecológica e seu potencial biotecnológico. De acordo com o estudo realizado por Victoria & Pereira (2007) *S. uncinata* é a espécie que apresenta maior índice de importância ecológica em Ponta Hennequin, Baía do Almirantado, Ilha Rei George. Estudos realizados em 2008 por Bhattarai *et al.*, mostram que, o musgo *S. uncinata* pode ser uma grande fonte de agentes antioxidantes naturais para a melhoria de cosméticos e aplicações medicinais. Outros estudos mostram que os atuais níveis de radiação UV-B no verão austral não afetam a atividade fotossintética de *S. uncinata* (LUD, 2003) e que, o aquecimento climático pode causar uma redução do ganho de carbono em algumas colônias ativas fotossinteticamente deste musgo. (NAKATSUBO, 2002).

Os musgos são extremamente importantes durante as fases iniciais de sucessão ecológica, em geral, são os primeiros colonizadores de locais perturbados. Ajudam a estabilizar a superfície do solo e assim reduzir a erosão e evaporação. São indicadores sensíveis de poluentes atmosféricos e as mudanças em seus padrões, como doenças, podem

indicar alterações ambientais, principalmente em um ambiente sensível a mudanças ambientais como a Antártica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a morfologia e fisiologia e a atividade patogênica de uma espécie de fungo muscícola que apresenta sistema de anéis concêntricos e ocorre na Ilha Rei George, Antártica.

2.2 Objetivos Específicos

- Testar o meio de cultura ideal para o cultivo desta linhagem de fungo formador de anéis.
- Verificar qual a amplitude térmica de crescimento deste isolado.
- Investigar quais os metabólitos secundários produzidos pelo isolado.
- Verificar o potencial patogênico deste isolado para o musgo *Physcomitrium acutifolium*.

3 MANUSCRITO

Este manuscrito está disposto na forma em que foi submetido para o Periódico **Fungal Diversity** (1560-2745) intitulado “Morphophysiological, enzymatic characterization and pathogenic activity of fungi isolate FIMA 665-5, found on the moss *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loesk, collected in King George Island, Antarctica”.

Morphophysiological, enzymatic characterization and pathogenic activity of fungi isolate FIMA 665-5, found on the moss *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loesk, in collected in King George Island, Antarctica

Graciéle C. ALVES¹, Margeli P. ALBUQUERQUE¹, Jair PUTZKE² Antonio B. PEREIRA¹

¹ Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Laboratory Interdisciplinary Center for Research - Biotechnology, Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica - NEVA, Street Aluizio Barros Macedo, Br 290, km 423, Neighborhood Pirai, São Gabriel, RS, Brasil. CEP: 97300-000.

² University of Santa Cruz do Sul (UNISC), Av. Independência 2293, CP 188, Santa cruz do Sul, RS - CEP 96815-900.

E-mails: graciele.cunhaalves@gmail.com; margelialbuquerque@unipampa.edu.br; jair@unisc.br; antoniopereira@unipampa.edu.br.

Abstract: Fungi forming concentric ring systems on moss carpets in Antarctica have been reported. However, due to the complexity of the information on these fungi are still fragmented without a complete characterization of these organisms. This study aimed to identify a fungus isolated from moss *Sanionia uncinata* and characterize it physiologic and biochemically and test its potential as mosse pathogen. The collections of material were conducted at the Brazilian Antarctic Expedition 2012/2013. For physiological characterization of the isolated there were tested different culture media (PDA, MEA and Sabouraud) and different temperatures (-6, 1, 5, 10, 20 and 30°C), where the rate of growth was measured every 24 hours until the growth of the colony reached the edge of the board of the Petri dish. The results were submitted to ANOVA and Tukey test using the Statistix 8 software. For the biochemical characterization were performed enzyme assays to verify the production of the pectinase, cellulase, protease and amylase enzymes in temperatures of 10 and 30°C. Pathogenicity tests were performed to evaluate the pathogenic activity obtained from the isolated extract and confronting disk diffusion test. Through molecular and phylogenetic methods the isolate was identified belonging to the genus *Penicillium* Link, one psychrotrophs organism, with growth between 1-30°C, and greater mycelial growth at 20°C. The culture medium which has more favorable nutritional conditions for mycelial growth of isolate is PDA medium. Regarding to pathogenicity, the isolate showed ability to inhibit the *in vitro* growth and cause complete discoloration in the moss gametophytes.

Keywords: Pathogenicity, *Penicillium*, fungi forming rings, Antarctica.

Introduction

The distribution of fungi in Antarctica is related to their “hosts” such as birds, invertebrate populations and vegetation, such consisting mainly by lichens and bryophyte communities (Tosi et al., 2002). The presence of fungal pathogens of mosses has been reported since the mid 19th century (Racovitza, 1959) and it is posited to play important roles in nutrition cycle, dynamics population, and small-scale disturbances that changes community composition in Bryophyte dominated ecosystems and explore different nutritional microniches within the gametophyte. There are records of fungi forming concentric rings on moss carpets for regions of Antarctica (Wilson, 1951; Hawksworth, 1973; Longton, 1973; Fenton, 1983; Tojo et al., 2012) and studies show that bryophytes are a rich source of fungal material (Azmi & Seppelt, 1998; Tosi et al., 2002). However, mosses do not produce “pathogen targets”, such as storage structures rich in nutrients, or specialized transport tissues rich in photosynthetic products found in vascular plants, fungal pathogenesis of mosses, has been reported with a frequency ever increasing (Davey & Currah, 2006).

Abiotic factors as temperature, water and nutrient availability influence fungal growth on the natural environment and nutrition can have a big impact on pathogenic interactions moss-fungi (Dix & Webster, 1995; Davey & Currah, 2006). The vast majority of non-lichenized fungi described to Antarctica until now, are cosmopolitan, where many of these fungi may be transient propagules introduced by air currents or by human and animal activity. But some species seem to be well established in individual ecological niches (Bridge & Spooner, 2012). One of the characteristics that may have part in the establishment of a species in a particular niche is the ability to produce secondary metabolites. The genus *Penicillium* Link is important in food, pharmaceutical and biotechnology industry, due to secondary metabolites that are produced. Ecologically they are recyclers of organic matter of all types, and they could be used as biological indicators because they are commonly contaminants of humans, food and materials (Duong, 1995; McRae et al., 1999; Prusky et al., 2004).

Species belonging to the *Penicillium* are cosmopolitan and have been frequently isolated from samples of antarctic mosses (Azmi & Seppelt, 1998; McRae et al., 1999; Tosi et al., 2002; Zhang et al., 2013). The fungi can produce a large variety of hydrolytic enzymes in order to accelerate the chemical reactions of metabolism. However, these enzymes are quite specific in its function; some can be detected in all species, while others can be preferably produced by some species of fungi when submitted to specific environmental conditions (Espósito & Azevedo, 2004). Specific fungal enzymes may contribute to the ability to grow

and survive in a hostile environment characterized by low temperatures and limited availability of organic matter (Bradner et al., 1999).

Aiming at the pathogenic potential of the fungi and their ability to produce secondary metabolites, this study claims about the characterization of isolated named FIMA 665-5 found on the moss *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske collected in King George Island. Through the physiological, molecular characterization and the enzymatic profile, it was also verified its capacity while a pathogen of mosses.

Material and Methods

The collections of material for study were conducted during the austral summer in Brazilian Antarctic Expedition XXXI/2012-2013, on King George Island (62° 9' 37.41"S 58° 28' 7.62"O). The samples containing the ring-forming fungi, were collected and placed in sterile zips bags and frozen for transport to Brazil. In the laboratory the samples were subjected to 10°C for thawing. In a laminar flow hood were isolated with the aid of tweezers, pulling small fragments of the forming region of the ring samples that were present in the moss *Sanionia uncinata*. The strain used was inoculated on Petri plates containing Sabouraud medium culture (dextrose agar 4% - Acumedia) with addition of 1% tartaric acid (Labsynth), adjusted at pH 4 and maintained in glasshouse (model Q315F25 - Quimis) at 26°C ± 1, in absence of light. The mycelial growth was monitored in periods of 24 hours after isolation. For all experiments were utilized Petri dishes with 9 cm diameter.

Radial mycelial growth x temperature: The plates isolate were incubated with culture sabouraud, adjusted at pH 4, at temperatures of -6°C, 1°C, 5°C, 10°C, 20°C, 26°C and 30°C in greenhouse photoperiod, with the absence of light. It was used for each treatment 20 replicas, which plugs (9 mm) of agar containing mycelium active arranged in the center of Petri dishes and maintained in glasshouse with photoperiod for 24 hours. The diameter of the colony was measured with a digital caliper (Mitutoyo) by the verse of the plates every 24 hours in 4 directions, until the mycelial growth of a colony reached the edge of the board. The mean diameter of each replica for each treatment was calculated. The results were subjected to analysis of variance to compare the means and Tukey test ($p < 0.05$) using the Statistix 8.0 software (Albuquerque et al., 2012).

Radial mycelial growth x culture medium: Different culture media was tested PDA (potato dextrose - Labsynth, pure bacteriological agar - Vetec), MEA (malt extract power - Himedia, agar) and Sabouraud (4% dextrose agar - Acumedia). Was transferred plugs (9 mm in diameter) of agar containing mycelium active disposed in the center of Petri dishes and kept in glasshouse with photoperiod at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ in the absence of light for 24 hours. It was used 20 replicas for each treatment. The diameter of the colony was measured with a digital caliper (Mitutoyo) by the verse of the plates every 24 hours in 4 directions, until the mycelial growth of a colony reached the edge of the board. The mean diameter of each replica for each one of the treatments was calculated. The results were subjected to analysis of variance to compare the means and Tukey test ($p < 0.05$) using the Statistix 8.0 software (Albuquerque et al., 2012).

Characterization of colony: The characterization of the cultures was performed by the method of Noble (1965) using the culture media Sabouraud and PDA. The macroscopic structures were analyzed mycelium color, color change of the culture medium or substances produced, the type of mycelial growth, or if the mycelium is aerial or submerged and the texture of the edge of the colony type. For the microscopic structures of the kind hyphae, their size, scale, presence or absence of connection clamps and chemical reactions were analyzed.

Staining of nucleus: Isolated fragments were fixed on a lamina and this were dipped in HCl (3M) in a Petri dish (enough to cover the blade volume), capped for 20 minutes. After hydrolysis the slide was transferred to another Petri dish containing a 3:1 mixture of 95% ethanol and glacial acetic acid and capped for 20 minutes; The blade was transferred to another Petri plate containing 70% alcohol and closed for 20 minutes, again the blade was submitted to a further washing in a Petri dish containing alcohol 99.05% and closed for 15 minutes, then the blade is removed to drying at room temperature. Afterwards it was leaky Giemsa dye (prepared with 3 drops of commercial Giemsa powder per milliliter) on the lamina after 5 minutes and it was washed with distilled water in a slow stream to prevent damage or loss of material (Herr, 1979 adapted).

The DNA extraction, PCR amplification and purification: The DNA extraction the material was performed with Norgen (Biotec Corp.) plant/fungi DNA isolation kit according to the manufacturer's instructions. The region for amplification of the internal transcribed spacers (ITS), was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers S3126T

(5'-ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT-3'), S2234C (5'-GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC-3'), FFITS4R (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), FFITS5F (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'); and it was performed as followed initial denaturation 30 cycles of 95°C for 2 min, denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 50°C for 30 s and extension at 75°C for 2 min; and a final extension at 72°C for 5 min. The DNA was purified from the PCR product using PROMEGA Wizard® purification kit (SV Gel and PCR Clean-Up) according to the manufacturer's instructions. Purified PCR products were sequenced by ABI – PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Phylogenetic analyzes and Phylogenetic tree construction: The result of sequencing was submitted to the BioEdit Sequence Alignment Editor program, for editing and alignment of biological sequences. After the sequences, they were submitted to MEGA 5.1 program and the GenBank database to determine the classification and the closest matches. To determine the similarities and differences alignment of the sequences, it was performed together with the result of the closest sequences and fungi cited for the Antarctic region. The phylogenetic tree was constructed using MEGA 5.1 and the Neighbor-Joining algorithm with bootstrap values calculated from 1.000 replicate runs the program. The maximum composite likelihood model was used to estimate evolutionary distance. The sequence determined in the study were deposited in GenBank under accession number KP325676.

Enzyme assays: For enzyme assays plugs (9 mm) were transferred to isolate Petri dishes containing suitable culture media, to verify the production of enzymes amylase, pectinase, cellulose and protease, and incubated at 10° and 30°C ± 1 until 12 days. It was used 4 replicates for each treatment. The amylase production was determined in agar (1,0%), starch (1,0%) and 1,0 M phosphate citrate buffer, pH 5,0. The identification of amylase activity was performed by adding 3 ml of iodine tincture. The formation of a yellowish halo around the colony indicates the presence of starch degradation. The yellow area is termed hydrolysis halo (Soares et al., 2010). To check the protease production culture medium containing agar (1,8%), colorless gelatin (1,0%), skimmed milk powder (1,0%) and citrate-phosphate buffer was used 0,1 M, pH 5,0. The formation of a translucent halo, during mycelial growth on the dish indicates the production of protease (Teixeira, 1994). The cellulosic activity was detected in agar (1,8%), carboxymethylcellulose (1,0%) and sodium acetate buffer 0,1 M, pH 5,0. The identification of cellulosic activity was performed by adding the dye Congo Red (0,1 g / 100 ml - Vetec) (Teixeira, 1994).

The pectinase production was determined in agar (1,8%), citrus pectin (1,0%- Delaware) and sodium acetate buffer 0,1 M, pH 5,0. The identification of pectinase production was verified with the formation of a halo, after addition of HCL solution (5N) (Teixeira, 1994).

Preparation of fungal extract: The isolate fungus was cultured by Smedium at temperature of $10^{\circ}\text{C} \pm 1$, until obtain sufficient mycelial mass. The aqueous extract was prepared according to Stein & Klingauf (1990), with adaptations. The mycelium was macerated and immersed in 1000 ml of distilled water and kept at room temperature. After 24 hours, it was effected the stirring and filtration. To each 1000 ml of distilled water, 250 g of isolate were employed. The extract was performed with filter paper sterilized until the stay extract less viscous. Then, the extract was subjected to new filtration for decontamination with syringes containing supports (Millipore) of 13 mm diameter and membranes (Millipore) with $0,22 \mu\text{M}$ of pore. All procedures were performed in a laminar flow hood.

Test chemical pathogenicity *in vitro*: The fungal aqueous extract was added in different concentrations (25 and 50%, equivalent to 25 and 50 ml) substituting the water in the Murashige and Skoog, 1962 (MS) culture medium, the other nutrients of culture medium were not modified. For this experiment, 4 replicates with 4 gametophytes per Petri dish were used for each treatment and a control without added extract was maintained for comparison. In culture media, it was inoculated 4 healthy gametophytes of the moss *Physcomitrium acutifolium* Broth., used as the experimental model *in vitro*. Kept in glasshouse at $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ with photoperiod of 16 h light / 8 h dark and monitored during the period of 25 days.

Confrontation test *in vitro*: The tests were performed using as base the disc diffusion method (Bauer & Kirby, 1966 modified). Disks (9 mm) with mycelium was inoculated in the center of Petri dishes containing MS medium for plants and 6 healthy gametophytes of the moss *Physcomitrium acutifolium* (Figure 1). The plates kept in glasshouse with photoperiod of 16 h light/8 h dark at $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. For this experiment it was used 10 replicates, monitored daily, after the 7th day of incubation.

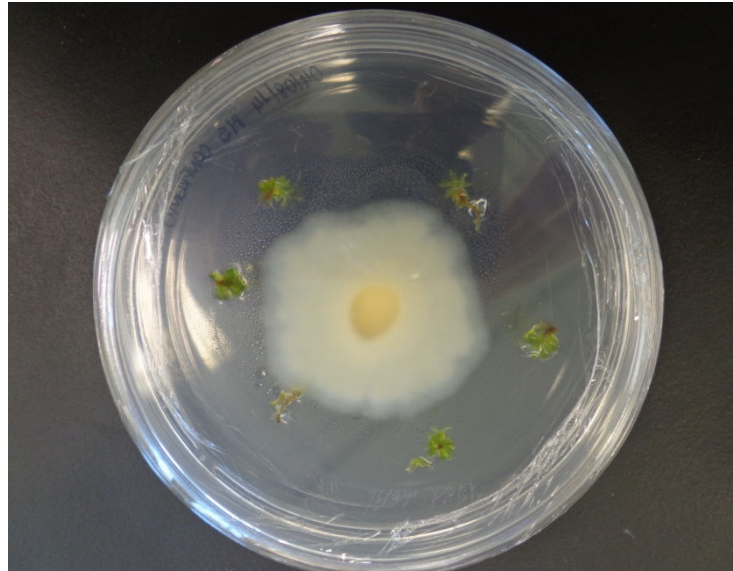


Figure 2: Disc diffusion method modified, after 9 days.

Results

Radial mycelial growth x temperature: Tests of different temperatures demonstrate that in the temperature of -6°C there was no radial mycelial growth. When submitted to the temperature of 5°C the isolation took 27 days to reach the edge of the plate, but the mycelium was more dense. At the temperature of 20°C the isolation showed the highest mycelial growth, reaching the edge of the plate in only 5 days, but the mycelium showed to be more thin (Figure 2).

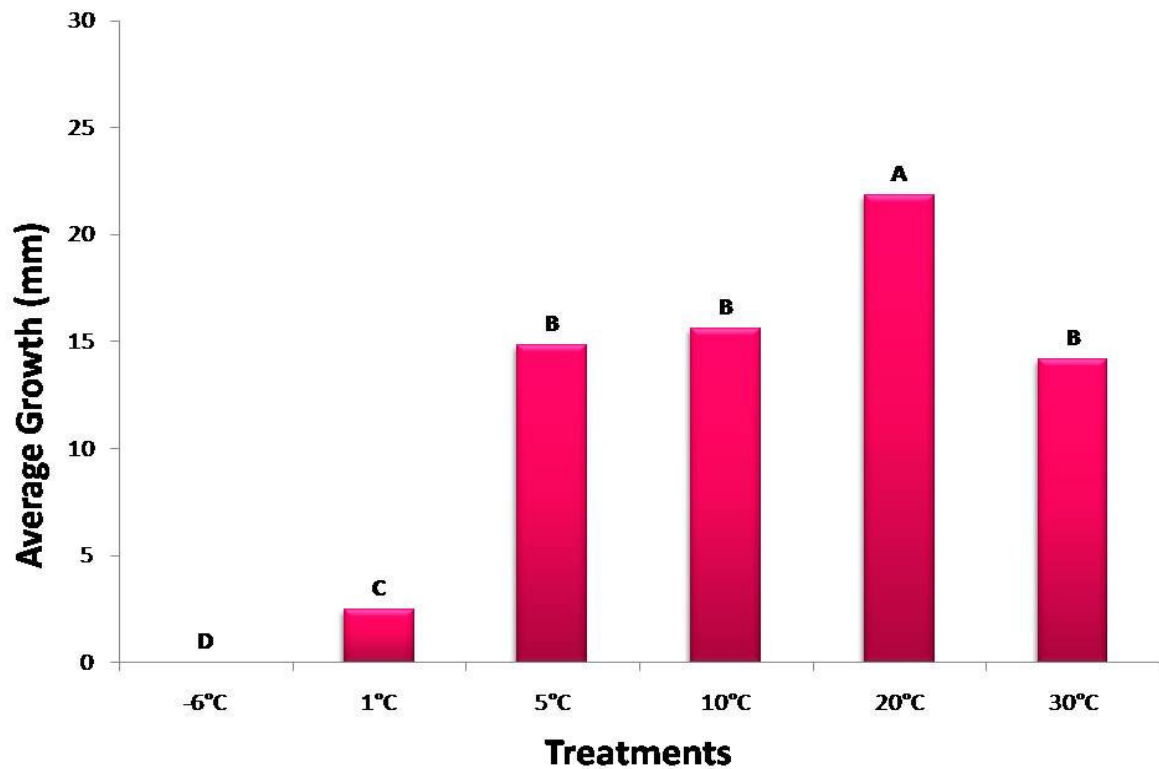


Figure 2. Average radial mycelial growth of the isolated FIMA 666-5 in different treatments (temperature). The letters represent statistical differences ($p < 0,05$).

Radial mycelial growth x culture medium: Tests of different culture media demonstrate that the PDA culture medium has more favorable nutritional conditions for mycelial growth of isolate as compared to other culture media (Table 1). The isolation presented total growth at 4 days in culture media PDA and Sabouraud. The MEA medium was where the isolate led longer time to reach the edge of the plate, totaling 6 days.

Table 1. Comparison of the radial mycelial growth of the isolated FIMA 665-5 in different culture media. The letters represent statistical significant differences ($p < 0,05$).

Culture media	Mean (mm)
PDA	27.188 A
Sabouroud	23.055 AB
MEA	21.585 B

Characterization of colony: Macroscopic structures: The texture of the colony is cottonous, white with aerial mycelium and has a plain topography (Figure 3). The isolate has the same texture, topography and color of the colony for all temperatures and tested media, except for the temperature of 30°C that has a wrinkled topography with deep furrows that radiate from the center irregularly (Figure 4). Microscopic Characteristics: The hyphae of the colony have septa evident and presence of vegetative and aerial hyphae (Figure 3). The isolate did not formation of conidia in any temperatures and tested media. But some samples showed, after 8 days in Sabouraud medium, formation of intermediate chlamyospore thick walled ($4 - 9,30 \mu\text{m} \times 5 - 7,28 \mu\text{m}$) (Figure 5).

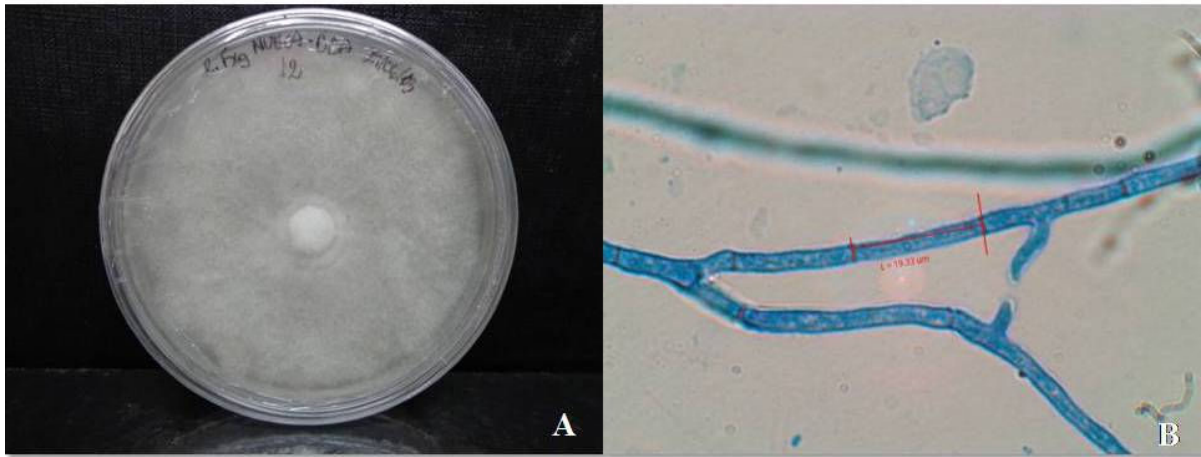


Figure 3: Culture of the isolate FIMA 665-5 (A). Septate hyphae - 19,33 μm (B).

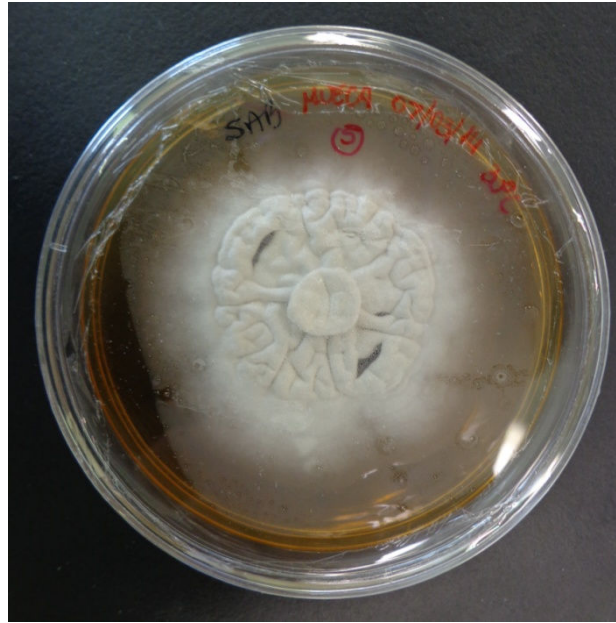


Figure 4: Formation of cracks and deep grooves in the isolated colony FIMA 665-5, in Sabouraud medium at temperature of 30°C.

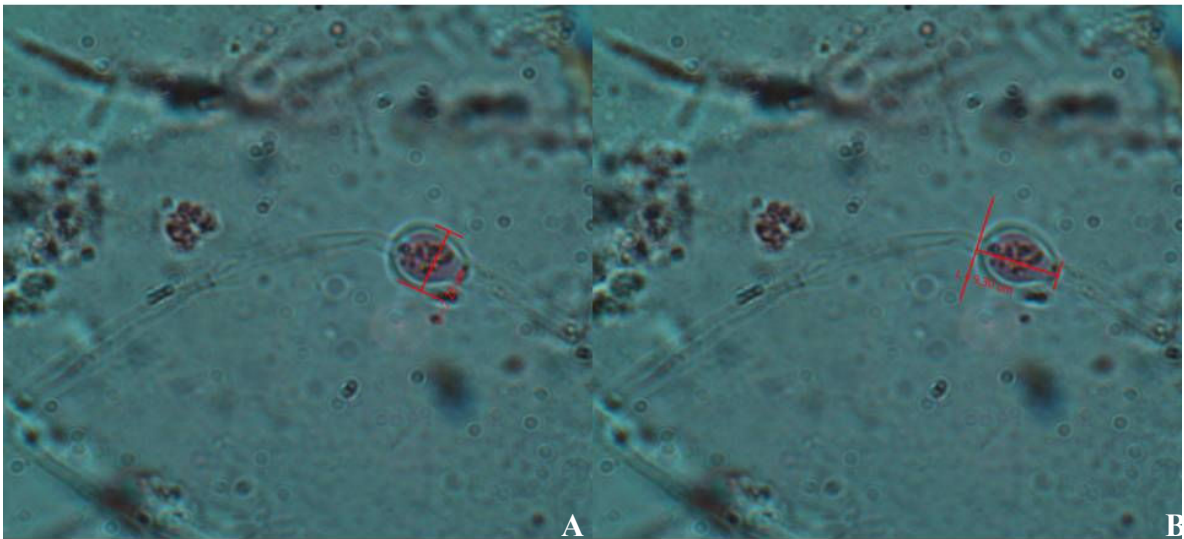


Figure 5: Intercalary chlamydospore (7,28 μm x 9,30 μm) stained with Congo Red dye (A and B).

Staining of nucleus: The purpose of coloring core was quantify the nuclei of the isolated as a tool for morphological characterization and identification of the species. The isolated presented binucleate hyphae (2 cores) and multinucleated hyphae (4 cores) (Figure 6).

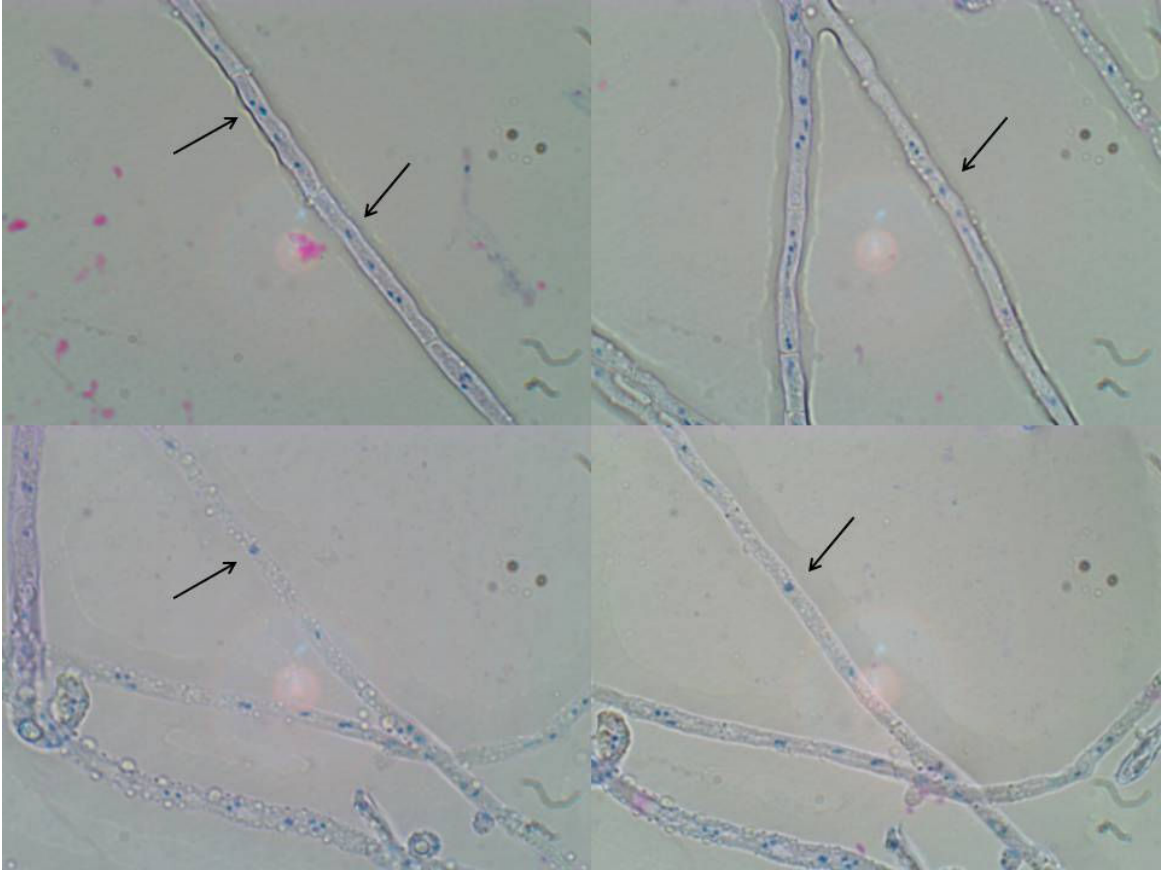


Figure 6: Photomicrographs of binucleate and multinucleate FIMA 665-5 isolates, showing depicting staining technique HCL-Giemsa.

Phylogenetic analyzes and phylogenetic tree construction: According to phylogenetic analyzes and sequence similarity, isolate FIMA 665-5 in study belongs to the clade *Penicillium* (Figure 7). Most groups used, previously identified, are samples referred to Antarctica and samples associated with bryophytes.

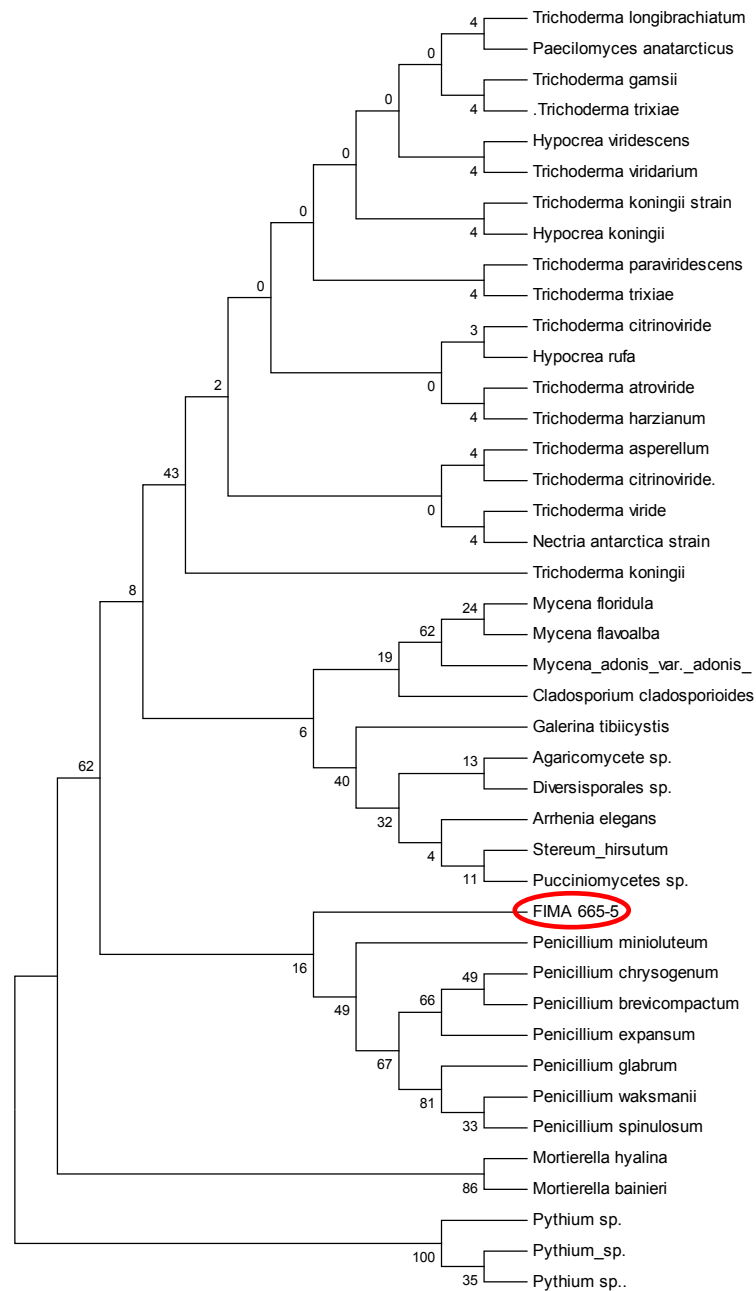


Figure 7: Phylogenetic tree based on analyzes showing the relationships between different species of *Penicillium* with isolated FIMA 665-5. Being the external group formed by *Pythium* sp.

Enzyme assays: The production of amylase was observed in the temperature of 10°C and 30°C after 4 and 8 days inoculation, respectively. Showing the largest production occurred in the temperature of 30°C (Figure 8). The production of protease was observed only in the temperature of 30°C, after 3 days inoculation of the isolate. (Figure 8). The isolate did not produce pectinase at 10°C and did not present growth of colony at 30°C. Cellulase production

was verified only at the temperature of 10°C, after 12 days inoculation of the isolated (Figure 8).

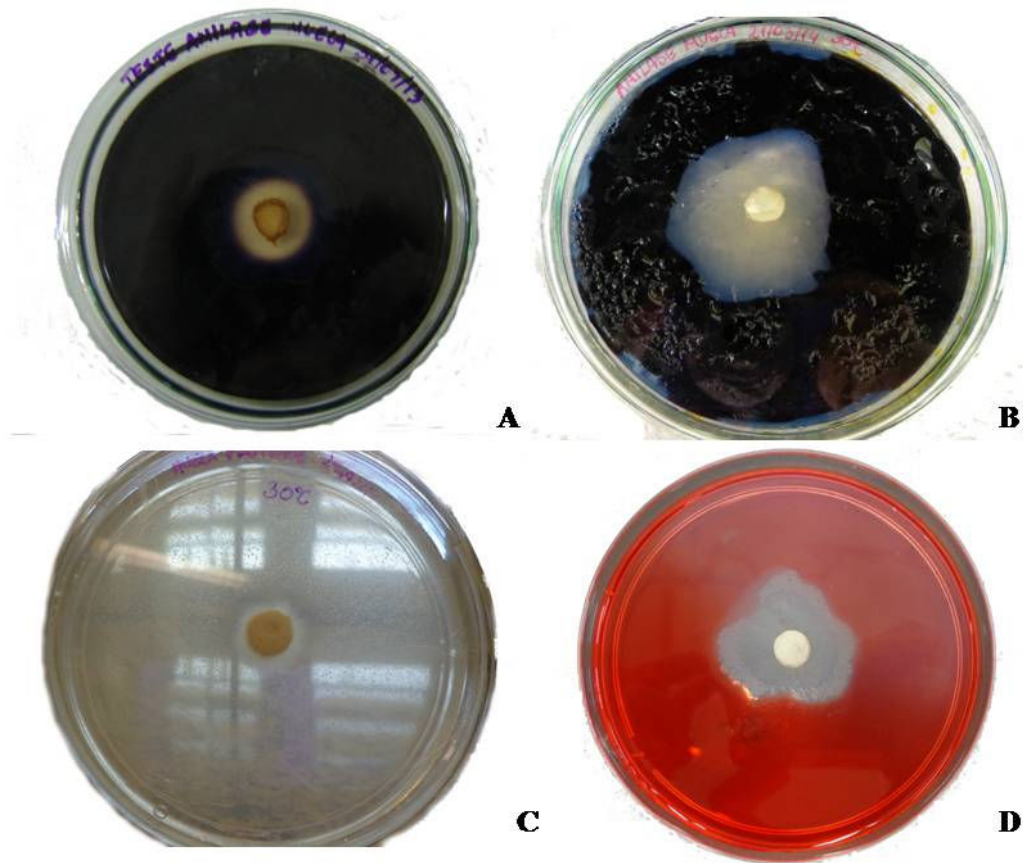


Figure 8: Production of amylase at 10°C and 30°C (A, B); production of protease at 30°C (C); production of cellulase at 10°C (D).

Test chemical pathogenicity *in vitro*: The pathogenicity test *in vitro* demonstrated that the aqueous extract obtained of isolated have inhibitory effect on the growth of moss *Physcomitrium acutifolium* while the control showed formation of rhizoids and new gametophytes *in vitro*. Culture media containing percentages of 25% and 50% showed no development and 5 of 16 gametophytes inoculated exhibited complete yellowing after 7 days, in the culture medium at 50% extract (Figure 9).

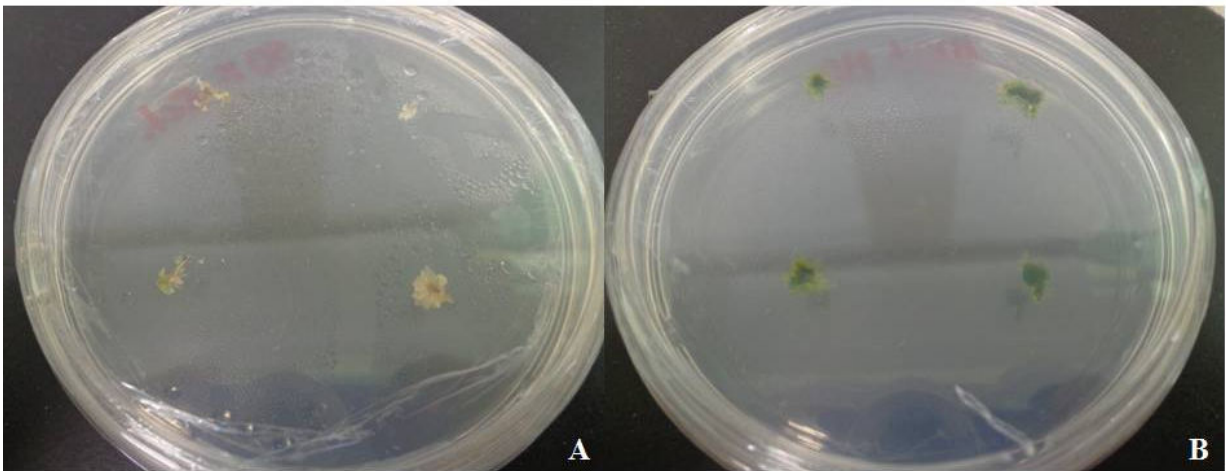


Figure 9: Gametophytes submitted to fungal extract 50% (A); Control without addition of fungal extract (B). Both after 7 days incubation.

Confrontation test *in vitro*: These results show that the isolated FIMA 665-5 besides possessing inhibitory effect on the growth of mosses, it is also a pathogen of moss (Table 2).

Table 2: Symptoms presented by the gametophytes by incubation time.

Incubation Time	Symptoms of gametophytes
7 days	Without development of gametophytes (Figure 10).
10 days	Without development of gametophytes, yellowing in the base of some gametophytes (Figure 10).
12 days	Without development of gametophytes, more than half of gametophytes, of all dishes, with complete discoloration (Figure 10).
15 days	Without development of gametophytes, all gametophytes, of all dishes, presented total discoloration (Figure 10).

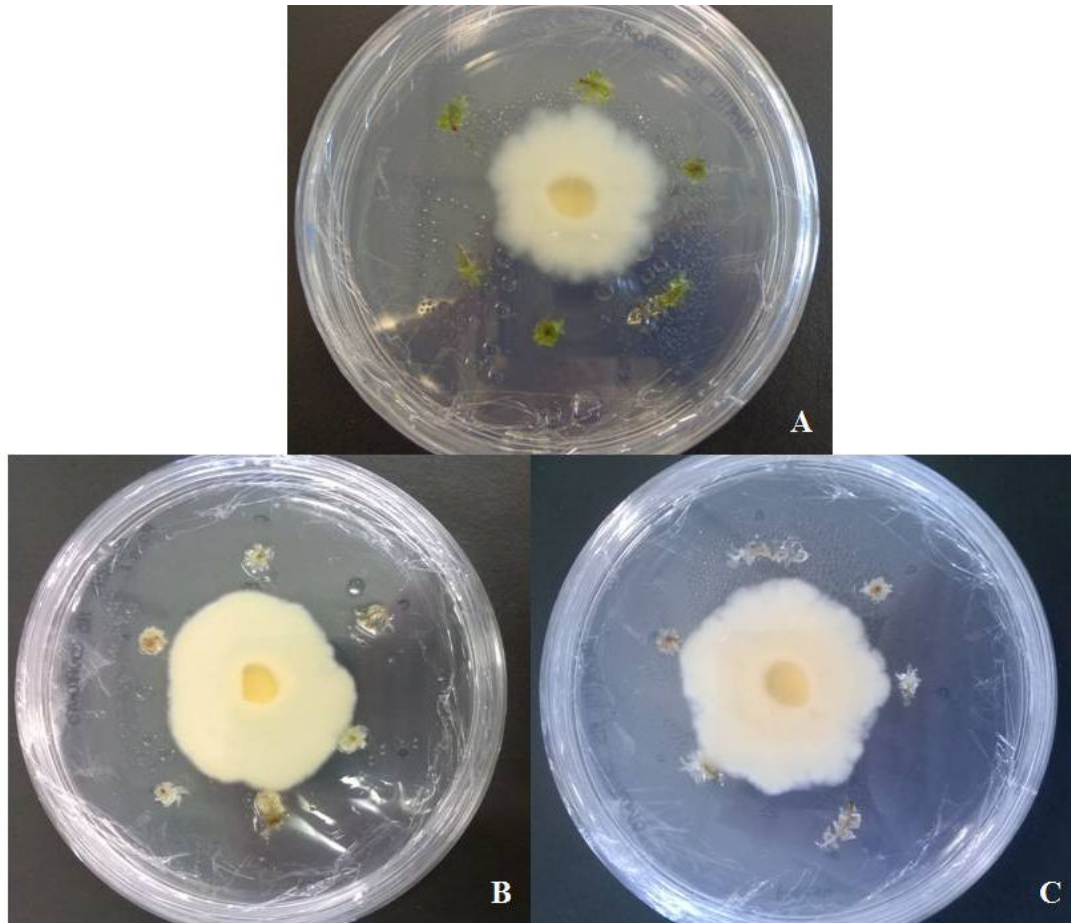


Figure 10: Confrontation test: gametophytes 10 days of incubation (A); gametophytes with 12 days of incubation (B); gametophytes 15 days of incubation (C).

Discussion

Phylogenetic analyzes showed that the isolate in study belongs to the taxon *Penicillium*, being one of the most common genera found in regions of Antarctica (Fletcher et al., 1985; Broady et al., 1987; Mercantini et al., 1989; McRae et al., 1999; Corte et al., 2000; Tosi et al., 2002; Connell et al., 2006; Godinho et al., 2013). The identification of the species belonging to *Penicillium* is not easy task, because the group has a large number of species. Many species of the genus have similar characteristics when cultivated in determined culture media and on the other hand, isolates of a single species may exhibit different characteristics, when cultivated in different culture media (Marek et al., 2003; Dean et al., 2005; Tiwari et al., 2011). One of the morphological characteristics of the genus is the formation of conidia, the isolated FIMA 665-5 did not show formation of conidia in any temperatures and tested media. However, it showed the formation of chlamyospore (Figure 3) having the resistance function and is

formed in adverse environmental conditions such as shortage of nutrients, water and temperatures not favorable to fungal development (Kern et al. 2003). Thus, method of identification by morphological examination cannot be utilized alone.

Different species have distinct nutritional requirements (Griffin, 1994) and generally exhibited different patterns of substrate utilization (Leung, et al., 2011). The test with different culture media showed that the PDA medium is nutritionally more favorable for mycelial growth of isolate FIMA 665-5. The knowledge of nutritional requirement, in the case substrate and temperature, for Antarctic fungi might indicate the conditions of its development in different environments. According to Davey & Currah (2009) the rapid growth and abundant production of mycelium are two important factors to spread and survival of fungi in environmental conditions. The isolate has rapidly growth in speed when subjected to milder temperatures ranges, it is possibly a strategy for rapid development and colonization this environment in seasons of the austral summer; which happens the thaw and temperatures are milder compared to the winter. Earlier studies in polar regions demonstrate that most of the fungal isolates have a maximum growth rate between 15-25°C (Kerry, 1990; Zuconni et al., 1996; Robinson, 2001; Tosi et al., 2002., Tojo et al., 2012). The isolate when submitted to temperature of 30°C presented a slower growth, but the mycelium showed to be dense with the formation of deep grooves, a topographic colony totally different of those colonies subjected to lower temperatures (Figure 4). These data suggest that FIMA 665-5 is psychrotrophic, using the definition of that microorganisms with minimal temperature of growth between -5°C / 5°C and maximum temperature of 30°C / 35°C (Gava et al. 2008). The psychrotrophic fungi, which grow at lower temperatures, dominate the fungal floras in certain polar habitats (Kerry, 1990). Aside from the availability of a suitable food source, examples of other factors that influence the growth of fungi are moisture, temperature, pH and oxygen (Alexopoulos et al., 1996). The isolate in study demonstrate that in temperature between 20-26°C it has a fast growth rate, but the mycelium was more flimsy (Figure 4). In temperatures between 1-10°C the isolate had a slower rate of growth, but has a denser mycelium (Figure 4). The growth rate and ambient temperature is an important determinant for the success and colonization of a species, and low temperatures are a limiting factor for the development of fungal species in Polar regions (Kerry, 1990).

Fungi are important decomposers, and therefore factors affecting their activity affect ecosystems as a whole, their growth and activities distinct metabolites of fungi are responses of physical-chemical conditions of the environment which surrounds them (Jenkin, 1975; Esposito & Azevedo, 2004). The fungi have the ability to occupy different environments, and

this great diversity of environments, ensured these organisms evolutionarily the ability to synthesize a number of enzymes with different characteristics (Gokua et al., 1997). Several physiological mechanisms of cold tolerance by fungi have been proposed, and one of these strategies would be the production of cold-active enzymes (Robinson, 2001). Among the cold-active enzymes produced by fungi in arctic environments protease and amylase are cited (Weinstein et al., 1997; Fenice et al., 1998; Robinson, 2001). The production of amylase at 10°C may be one of the mechanisms used by isolate FIMA 665-5 to survive in the antarctic environment. Robinson (2001) points out that the enzymes active at low temperatures are produced by species of mycorrhizal fungi and decomposing in the Arctic and Antarctic environment. Singh & Singh (2012) did chemical analysis in strains of filamentous fungi and yeast into cryoconite holes from Midre Lovénbreen glacier. This analysis showed that the secretion of enzymes by cold-adapted conducted the process of degradation of organic macromolecules, thus contributing to the nutrient cycling in sub-glacial environments.

The synthesis of secondary metabolites can assure the fungi advantages in habitats where it needs to compete with other organisms, therefore, many of these metabolites may exhibit toxic or inhibitory effects on other organisms (Khaldi et al., 2010). This is shown in the confrontation test by disk diffusion, where FIMA 665-5 produces secondary metabolites that inhibits the growth of moss and may even lead to complete discoloration of the gametophyte. Perhaps this is the cause of brown and yellow stains on the moss *S. uncinata*, in the antarctic environment and with *Physcomitrium in vitro*. *Penicillium* species isolated from Antarctic macroalgae has the ability to produce bioactive extracts and antifungal activity. Furthermore, other species have the capacity to inhibit 100% of trypanomastigote forms (Godinho et al., 2013). Several species of *Penicillium* produce toxic secondary metabolites called mycotoxins (Rundberget & Wilkins, 2002; Fog Nielsen, 2003; Rundberget et al, 2004) in what the importance of these compounds may vary due to environmental and biological factors of each species (Pitt, 2000). Moreover, these metabolites may have a biotechnological potential, because the isolation in study present enzymatic activity after three day of inoculation. However, more biochemical studies conducted for used these metabolites industrially. *Penicillium* is a genus worldwide known for its production of extracellular enzymes and secondary metabolites of commercial value (Tiwari et al., 2011). Species of the genus has been reported in association with the Antarctic mosses and the ecological relationships that occur between these organisms is important. The isolate FIMA 665-5 in experimental conditions was able to inhibit growth and cause complete discoloration in the

gametophytes of moss *Physcomitrium acutifolium*. This biological characteristic of FIMA 665-5 may be occurring in a similar way in the Antarctic environment.

Acknowledgements

This work integrates the National Institute of Science and Technology Antarctic Environmental Research (INCT-APA) that receives scientific and financial support from the National Council for Research and Development (CNPq process: n° 574018/2008-5), Carlos Chagas Research Support Foundation of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ n° E-16/170.023/2008) and Foundation for Research Support of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS) for providing scholarship. The authors also acknowledge the support of the Brazilian Ministries of Science, Technology and Innovation (MCTI), of Environment (MMA) and Inter-Ministry Commission for Sea Resources (CIRM).

References

Albuquerque, M. P.; PEIL, R. M. N.; NASCIMENTO, J. S. (2012). Crescimento Micelial de *Lentinus sajor caju* (Fr.) Fr. e *Pleurotus* spp. em diferentes resíduos agrícolas. Bioscience. Journal.Uberlândia; 28 (5): 895-902.

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. (1996). Introductory Mycology, John Wiley & Sons, Inc., New York, 4th ed.; 865p.

Azmi, O. R., & Seppelt, R. D. (1998). The broad-scale distribution of microfungi in the Windmill Islands region, continental Antarctica. Polar Biology; 19 (2): 92-100. doi: 10.1007/s003000050219

Bauer, A. W., Kirby, E. M. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disk Method. American Journal of Clinical Pathology; 45: 493-496.

Bradner, J. R., Gillings, M., & Nevalainen, K. M. H. (1999). Qualitative assessment of hydrolytic activities in Antarctic microfungi grown at different temperatures on solid media. World Journal of Microbiology and Biotechnology; 15 (1): 131-132. doi: 10.1023/A:1008855406319

- Bridge, P. D., Spooner, B. M. (2012). Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem? *Fungal Ecology*; 5(4): 381-394. doi: 10.1016/j.funeco.2012.01.007
- Broady, P., Given, D., Greenfield, L. & Thompson, K. (1987). The biota and environment of fumaroles on Mount Melbourne, Northern Victoria Land. *Polar Biology*; 7: 97-113.
- Connell, L., Redman, R., Craig, S. & Rodriguez, R. (2006). Distribution and abundance of fungi in the soils of Taylor Valley, Antarctica. *Soil Biology & Biochemistry*; 38: 3083-3094. doi: 10.1016/j.soilbio.2006.02.016
- Corte, A. M. (2000). Antibacterial activity of *Penicillium* spp. strains isolated in extreme environments. *Polar Biology*; 23: 294-297. doi: 10.1007/s003000050447
- Davey, M. L.; Currah, R. S. (2006). Interactions between mosses (Bryophyta) and fungi. *Canadian Journal of Botany*; 84 (10): 1509-1519. doi: 10.1139/b06-120
- Davey, M. L.; Tsuneda A.; Currah R. S. (2009). Pathogenesis of bryophyte hosts by the Ascomycete *Atracidymella muscivora*. *American Journal of Botany*; 96 (7): 1274-1280. doi: 10.3732/ajb.0800239
- Dean, T. R., Roop, B., Betancourt, D., Menetrez, M. Y. (2005). A simple multiplex polymerase chain reaction for the identification of four environmentally relevant fungal contaminants. *Journal of Microbiology Methods*; 61: 9-16. doi: :10.1016/j.mimet.2004.10.015
- Dix, N. J., and J. Webster. (1995). *Fungal ecology*. Chapman & Hall, London, United Kingdom. 549 p.
- Duong, T. A. (1995). Infection due to *Penicillium marneffeii*, an emerging pathogen: review of 155 reported cases. *Clinical infectious diseases*; 23 (1): 125-130. doi: 10.1093/clinids/23.1.125
- Esposito, E.; Azevedo, J. L. (2004). *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Educ. Caxias do Sul. 510 p.

- Fenice, M., L Selbmann, Di Giambattista R, F Federici . (1998). Chitinolytic activity at low temperature of an Antarctic strain (A3) of *Verticillium lecanii*. *Research Microbiology*; 149: 289 - 300. doi: 10.1016/S0923-2508(98)80304-5
- Fenton, J. H. C. (1983). Concentric fungal rings in Antarctic moss communities. *Transactions British Mycology Socociety*; 80: 415- 420. doi: 10.1016/S0007-1536(83)80038-2
- Fletcher, L.D., Kerry, E.J. & Weste, G.M. (1985). Microfungi of Mac Robertson and Enderby Lands, Antarctica. *Polar Biology*; 4: 81-88. doi: 10.1007/BF00442904
- Fog Nielsen, K. (2003). Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal genetics and biology*; 39(2): 103-117. doi: :10.1016/S1087-1845(03)00026-4
- Gava, A. J., Da Silva, C. A. B., Frias, J. R. G. (2008). *Tecnologia de Alimentos: princípios e aplicações*. São Paulo, Nobel. 511 p.
- Godinho, V. M., Esteves, L. F., Santiago, I. F., Pellizzari, F. M., Yokoya, N. S., Pupo, D., Alves, T. M. A., Junior, P. A. S., Romanha, A. J., Zani, C. L., Cantrell, C. L., Rosa, C. A., Rosa L. H. (2013). Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *The ISME Journal (Print)*, 7: 1434-1451. doi:10.1038/ismej.2013.77
- Gouka, R. J., Punto, P. J., Van Den Hondel, C. A. M. J. J. (1997). Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, minitutions and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 47 (1): 1-11. doi: 10.1007/s002530050880
- Griffin, D. H. (1994). *Fungal Physiology*, 2nd ed. Wiley Liss, New York.485p
- Hawksworth D. L. (1973). *Thyronectria antarctica* (Speg.) Seeler var. *hyperantarctica* var. nov. *British Antarctic Survey Bulletin*; 32: 51-53.
- Herr, L. J. (1979). Practical nuclear staining procedures for Rhizoctonialike fungi. *Phytopathology*; 69: 958-961.

- Jenkin, J. F. (1975). Macquarie Island, subantarctic. In: Rosswall T. A., Heal O. W. Structure and function of tundra ecosystems. Stockholm. Ecological Bulletins; 20: 375-397.
- Kern, M. E., Blevins, K. S. (2003). Medical Mycology-Text and Atlas. 2nd ed. São Paulo: Editorial Premier. 276 p.
- Kerry, E. (1990). Effects of temperature on growth rates of fungi from Subantarctic Macquarie Island and Casey, Antarctica. Polar Biology; 10(4): 293-300.
- Khaldi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H. Fedorova, N. D. (2010). SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. Fungal Genetics and Biology, 47 (9): 736-741. doi:10.1016/j.fgb.2010.06.003
- Leung, G., Robson, G. D., & Robinson, C. H. (2011). Characterisation of cold-tolerant fungi from a decomposing High Arctic moss. Soil Biology and Biochemistry; 43(9): 1975-1979. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.05.003
- Longton, R. E. (1973). The occurrence of radial infection patterns in colonies of polar bryophytes. British Antarctic Survey Bulletin; 32: 41-49.
- Marek, P., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K. (2003). Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. International Journal of Food Microbiology; 89: 139-144.
- Mercantini, R., Marsella, R. & Cervellati, M.C. (1989). Keratinophilic fungi isolated from Antarctic soil. Mycopathologia; 106: 47-52.
- McRae, C. F., & Seppelt, R. D. (1999). Filamentous fungi of the Windmill Islands, continental Antarctica. Effect of water content in moss turves on fungal diversity. Polar Biology; 22(6): 389-394.
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant; 15(3): 473-497.

- Noble, M. K. (1965). Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomyces. *Canadian Journal of Botany*; 43: 1097-1139. doi:10.1139/b65-126
- Pitt, J. I. (2000). A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC. 197 p.
- Prusky, D., McEvoy, J. L., Saftner, R., Conway, W. S., Jones, R. (2004). Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. *Phytopathology*, 94 (1), 44-51. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.1.44
- Racovitza, A. (1959). Étude systématique et biologique des champignons bryophiles. *Memoires du Museum National d'histoire naturelle. Botanique*; 10: 1-288.
- Robinson, C. H. (2001). A Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist*; 152: 341 - 353. doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00177.x
- Rundberget, T., Wilkins, A. L. (2002). Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A*; 964(1): 189-197. doi:10.1016/S0021-9673(02)00698-2
- Rundberget, T., Skaar, I., Flaoyen, A. (2004). The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food waste. *International journal of microbiologia de alimentos*; 90 (2): 181-188.
- Singh, P., Singh, S. M. (2012). Characterization of yeast and filamentous fungi isolated from cryoconite holes of Svalbard, Arctic. *Polar biology*, 35 (4): 575-583. doi: 10.1007/s00300-011-1103-1
- Soares, I. A., Flores, A. C., Zanettin, L., Pin, H. K., Mendonça, M. M., Barcelos, R. P., Trevisol, L. R., Carvalhos, R. D., Schauren, Rocha, C. L. M. S. C., Baroni, S. (2010). Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*; 30: 700-705.
- Stein, U., & Klingauf, F. (1990). Insecticidal effect of plant extracts from tropical and subtropical species. *Journal of Applied Entomology*; 110 (1-5): 160-166. doi: 10.1111/j.1439-0418.1990.tb00109.x

Teixeira, M. F. S. (1994). Obtenção de espécies de *Arpergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil.

Tiwari, K. L., Jadhav, S. K., & Kumar, A. (2011). Morphological and molecular study of different *Penicillium* species. *Middle-East Journal of Scientific Research*; 7: 203-210.

Tojo, M.; West, P. V.; Hoshino, T.; Kida, K.; Fujii, H.; Hakoda, A.; Kawaguchi, Y.; Mühlhauser, H. A.; Van De Berg, A. H.; Küpper, F. C.; Herrero, M. L.; Klemsdal, S. S.; Tronsmo, A. M.; Kanda, H. (2012). *Pythium polare*, a new heterothallic oomycete causing brown discoloration of *Sanionia uncinata* in the Arctic and Antarctic. *Fungal Biology*; 116 (7): 756-768. doi:10.1016/j.funbio.2012.04.005

Tosi, S.; Casado, B.; Gerdol, R.; Caretta, G. (2002). Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar Biology*; 25 (4): 262-268. doi: 10.1007/s00300-001-0337-8

Weinstein R. N., Palma M. E., Johnstone K., Wynn-Williams D. D. (1997). Ecological and Physiological Characterization of *Humicola marvinii*, a New Psychrophilic Fungus from Fellfield Soils in the Maritime Antarctic. *Mycologia* 89: 706 - 711.

Wilson, J.W. (1951). Observations of concentric 'fairy rings' in arctic moss mat. *Journal Ecology*; 39: 407-416.

Zhang, T., Xiang, H. B., Zhang, Y. Q., Liu, H. Y., Wei, Y. Z., Zhao, L. X., & Yu, L. Y. (2013). Molecular analysis of fungal diversity associated with three bryophyte species in the Fildes Region, King George Island, maritime Antarctica. *Extremophiles*; 17(5): 757-765. doi: 10.1007/s00792-013-0558-0

Zucconi, L., Pagano, S., Fenice, M., Selbmann, L., Tosi, S., & Onofri, S. (1996). Growth temperature preferences of fungal strains from Victoria Land, Antarctica. *Polar Biology*; 16(1): 53-61

4. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados obtidos neste estudo e todos os aspectos observados, conclui-se que o isolado FIMA 665-5 pertence ao gênero *Penicillium*. Trata-se de um organismo psicrotrófico, adaptado a baixas temperaturas. Com base nas análises moleculares, trata-se, possivelmente, de uma nova ocorrência para a Antártica, visto que, o isolado ficou externo ao grupo de espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* que ocorrem na Antártica. Sob condições, experimentais a linhagem estudada foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* do musgo *Physcomitrium acutifolium*.

Apesar de o isolado estudado estar ocorrendo sobre as comunidades vegetais na Antártica Marítima entre as temperaturas de 1°C e 30°C (inverno e verão), os ensaios realizados *in vitro* demonstraram o potencial de rápido crescimento micelial radial da linhagem estudada, principalmente na temperatura de 20°C. Essa característica biológica aliada ao aumento das médias de temperatura na Antártica ao decorrer dos anos poderá refletir na proliferação da população desta linhagem de fungo. Sugere-se que com o aumento na distribuição de fungos formadores de anéis a interferência no desenvolvimento de populações de *Sanionia uncinata* poderá ocorrer de forma análoga ao observado em *P. acutifolium*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIRI, A., BOMPERIX, G. (2005). Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments: consequences for delay development. *Plant Pathology* 54: 74-81.
- BHATTARAI, H. D., PAUDEL, B., LEE, H. S., LEE, Y. K., YIM, J. H. (2008). Antioxidant activity of *Sanionia uncinata*, a polar moss species from King George Island, Antarctica. *Phytotherapy research*, 22 (12): 1635-1639.
- BENNINGHOFF, S. W. (1987). The Antarctic Ecosystem. *Environment International*; 13: 9-14.
- BERS, A. V.; MOMO, F.; SCHLOSS, I. R.; ABELE, D. (2013). Analysis of trends and sudden changes in long-term environmental data from King George Island (Antarctica): relationships between global climatic oscillations and local system response. *Climatic change*; 116 (3-4), 789-803.
- BRAUN M. (2001). Ablation on the ice cap of King George Island (Antarctica). *Albert-Ludwigs-Universität Freiburg*. Freiburg. 165 p.
- BRIDGE, P. D., SPOONER, B. M., ROBERTS, P. J. (2008). Non-lichenized fungi from the Antarctic region. *Mycotaxon*, 106, 485-490.
- _____. (2010). List of non-lichenized fungi from the Antarctic region. Disponível em <http://www.antarctica.ac.uk/bas_research/data/access/fungi>. Acesso em 14 de agosto de 2014.
- _____, SPOONER, B. M. (2012). Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem? *Fungal Ecology*, 5(4), 381-394.
- CLARK, M. S.; CLARKE, A.; COCKELL, C. S.; TRANSMITIR, P.; DETRICH, H. W.; FRASER, K. P.; JOHNSTON, I. A.; METHE, B. A.; MURRAY, A. E.; PECK, L. S.; RÖMISCH, K.; ROGERS, A. D. (2004). Antarctic genomics. *Comparative and functional genomics*; 5 (3): 230-238.
- DAVEY, M. L.; CURRAH, R. S. (2006). Interações entre musgos (Bryophyta) e fungos. *Canadian Journal of Botany*; 84 (10): 1509-1519.
- _____; TSUNEDA A.; CURRAH R. S. (2009). Pathogenesis of bryophyte hosts by the ascomycete *Atracidium muscivora*. *American Journal of Botany*; 96 (7): 1274-1280.
- DÖBBELER, P. (2002). Microniches occupied by bryophilous ascomycetes. *Nova Hedwigia*; 75: 275-306.
- DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H. (1993). *Compendium of soil fungi*. vol 1. IHW-Verlag, Enching, Germany.
- DUONG, T. A. (1996). Infection due to *Penicillium marneffeii*, an emerging pathogen: review of 155 reported cases. *Clinical infectious diseases*, 23 (1), 125-130.

- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (2004). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Educs. Caxias do Sul. 510 p.
- FALLIK, E., GRINBERG, S., GAMBOURG, M., KLEIN, J. D., LURIE, S. (1996). Prestorage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. *Plant Pathology*, 45(1), 92-97.
- FENTON, J. H. C. (1983). Concentric fungal rings in Antarctic moss communities. *Transactions British Mycology Society*; 80: 415-420.
- FERRON, F. A.; SIMÕES, J. C.; AQUINO, F. E. (2001). Série Temporal de Temperatura atmosférica para a Ilha Rei George, Antártica. *Revista do Departamento de Geografia*; 14: 25-32.
- FOG NIELSEN, K. (2003). Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology*, 39(2), 103-117.
- GODINHO, V. M., FURBINO, L. E., SANTIAGO, I. F., PELLIZZARI, F. M., YOKOYA, N. S., PUPO, D., ALVES, T. M. A., JUNIOR, P. A. S., ROMANHA, A. J., ZANI, C. L., CANTRELL, C. L., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2013). Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *The ISME journal*, 7 (7), 1434-1451.
- GRIFFITH M. & EWART K. V. (1995). Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnology Advances*; 13: 375-402.
- HEDENÄS, L. (2003). The European species of the *Calliergon–Scorpidium–Drepanocladus* complex, including some related or similar species. *Meylania* 28: 1–116.
- INDEX FUNGORUM. Disponível em < <http://www.indexfungorum.org/>>. Acesso em 10 de agosto de 2014.
- KAPPEN, L.; & SCHROETER, B. (1997). Activity of lichens under the influence of snow and ice. *Proceedings of the NIPR Symposium. Polar Biology*; 10: 163-168.
- KENNEDY, A. D. (1995). Antarctic Terrestrial Ecosystem Response to Global Environmental Change. *Annual Review of Ecology and Systematics*; 26: 683-704.
- LONGTON, R. E. (1973). The occurrence of radial infection patterns in colonies of polar bryophytes. *British Antarctic Survey Bulletin*; 32: 41-49.
- LUD, D., SCHLENSOG, M., SCHROETER, B., HUISKES, A. H. L. (2003). The influence of UV-B radiation on light-dependent photosynthetic performance in *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske in Antarctica. *Polar biology*, 26 (4): 225-232.
- MARSZ, A. (2000). Charakterystyka fizyczno-geograficzna obszarów lądowych w otoczeniu Zatoki Admiralicji (Antarktyka Zachodnia, Sztatlandy Południowe, Wyspa Króla Jerzego). W. S. M. Gdynia. 125 p.

- MCRAE, C. F., SEPPELT, R. D. (1999). Filamentous fungi of the Windmill Islands, continental Antarctica. Effect of water content in moss turves on fungal diversity. *Polar Biology*, 22(6), 389-394.
- MOHAMMED, S., TE'O, J., NEVALAINEN, H. (2013). A gene encoding a new cold-active lipase from an Antarctic isolate of *Penicillium expansum*. *Current genetics*, 59 (3), 129-137.
- MÖLLER, C., DREYFUSS, M. M. (1996). Microfungi from Antarctic lichens, mosses and vascular plants. *Mycologia*, 922-933.
- MONTEIRO, M. C. P. (2012). Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus e Penicillium* em solos preservados do cerrado. Dissertação (Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 75 p.
- MOREY, P. R., HULL, M. C., ANDREW, M. (2003). El Niño water leaks identify rooms with concealed mould growth and degrade indoor air quality. *International Biodeterioration and Biodegradation* 52 (3): 197-202.
- NAKATSUBO, T. (2002). Predicting the impact of climatic warming on the carbon balance of the moss *Sanionia uncinata* on a maritime Antarctic island. *Journal of plant research*, 115 (2): 99-106.
- _____, OHTANI S (1992) Note on the structure of moss colonies composed of two species on King George Island, the South Shetland Islands. *Antarctict Rec* 36: 285–293
- NANDA, A., AKILA, S. (2014). Cytotoxicity Assay of Secondary Metabolites produced from Mould Fungi: *Penicillium* spp. *International Journal of PharmTech Research (USA)*. 6 (3), 954-958.
- NEWSHAM, K. K., BRIDGE, P. D. (2010). Sebacinales are associates of the leafy liverwort *Lophozia excisa* in the southern maritime Antarctic. *Mycorrhiza* 20: 307-313.
- OCHYRA, R. (1998). The moss flora of King George Island, Antarctica. Polish Academy of Sciences, W. Szafer Institute of Botany. Cracow. 198p.
- _____; LEWIS-SMITH, R. I.; BEDNAREK-OCHYRA, H. (2008). The Illustrated moss flora of Antarctica. Cambridge University Press. 685p.
- OLECH, M. (2004). Lichens of King George Island, Antarctica. The Institute of Botany of the Jagiellonian University, Kraków. 391 p.
- ØVSTEDAL, D. O., LEWIS-SMITH, R. I. (2001). Lichens of Antarctica and South Georgia: A guide to their identification and ecology. Cambridge. Cambridge University Press. 411 p.
- PEGLER, D. N., SPOONER, B. M., SMITH, R. I. L. (1980). Higher fungi of Antarctica, the Subantarctic zone and Falkland Islands. *Kew Bulletin* 35: 499-562.
- PEREIRA, A. L., PITA, J. R. (2005). Alexander Fleming (1881-1955), Da descoberta da penicilina (1928) ao Prêmio Nobel (1945). *Revista da Faculdade de Letras: História Porto*, 6, 129-151.

- PETERSON, S. W. (2000). Phylogenetic analysis of *Penicillium* species based on ITS and LSU-rDNA nucleotide sequences. In: Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Samson, R. A. and Pitt, J. I (Eds.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 163-178 p.
- PIANZZOLA, M. J., MOSCATELLI, M., VERO, S. (2004). Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. *Plant Disease*, 88(1), 23-28.
- PITT, J. I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London in McRae, C. F., Hocking, A. D., & Seppelt, R. D. (1999). *Penicillium* species from terrestrial habitats in the Windmill Islands, East Antarctica, including a new species, *Penicillium antarcticum*. *Polar Biology*, 21(2), 97-111.
- _____. (1988). A laboratory guide to common *Penicillium* species. (2nd ed.) North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), Division of Food Processing. 187 p.
- _____. (2000). A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC. 197 p.
- PHILPOT H. R. (1985). Physical geography-climate, in Key Environments Antarctica, W. M.; Bonner and D. W. H. Walton. Pergamon Press. Oxford; 23-28.
- PROANTAR (2001). Tratado da Antártica e Protocolo de Madri. Secretaria da Comissão Internacional para os Recursos do Mar-SECIRM. Brasília. 64 p.
- PRUSKY, D., MCEVOY, J. L., SAFTNER, R., CONWAY, W. S., JONES, R. (2004). Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. *Phytopathology*, 94 (1), 44-51.
- PTASZYŃSKA, A.; MUŁENKO, W.; ŻARNOWIEC, J. (2009). Bryophytes microniches inhabited by microfungi. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska*; 64 (2): 35-43.
- PUTZKE, J.; PEREIRA, A. B. (2001). The Antarctic Mosses With Special Reference to the South Shetlands Islands. Ulbra. Canoas. 196 p.
- RACOVITZA, A. (1959). É tude systematique et biologique des champignons bryophiles. *Memoires du Museum National d'histoire naturelle. Botanique*; 10 : 1-288.
- RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. (2007). Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*; 6: 127-141.
- RUNDBERGET, T., WILKINS, A. L. (2002). Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography* 964 (1), 189-197.
- _____, SKAAR, I., FLÅØYEN, A. (2004). The presence of *Penicillium* e *Penicillium* mycotoxins in food wastes. *International Journal of Microbiologia of Food*, 90 (2), 181-188.

SCHAEFER, C. E. G. R.; SIMAS, F. N. B.; FIALHO, M. R. A. (2004). Ecosistemas costeiros e monitoramento ambiental da Antártica Marítima. Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Viçosa: Núcleo de Estudo de Planejamento e Uso da Terra - NEPUT. 192 p.

SETZER, A. W.; ROMÃO M.; FRANCELINO, M. R.; SCHAEFER, C. E. G. R.; COSTA, L. M.; BREMER, U. F. (2004). Regime Climático da Baía do Almirantado: Relações com o ecossistema terrestre. p. 1-6. *In*: SCHAEFER, C. E. G. R.; SIMAS, F. N. B.; FIALHO, M. R. A. (2006). Ecosistemas costeiros e monitoramento ambiental da Antártica Marítima. Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Viçosa: Núcleo de Estudo de Planejamento e Uso da Terra-NEPUT. 192 p.

SIDEBOTTOM C.; BUCKLEY S.; PUDNEY P.; TWIGG S.; JARMAN C.; HOLT C.; TELFORD J.; MCARTHUR A.; WORRALL D.; HUBBARD R.; LILLFORD P. (2000). Heat-stable antifreeze protein from grass. *Nature*; 256-406.

SNIDER C. S.; HSIANG T.; ZHAO G.; GRIFFITH M. (2000). Role of ice nucleation and antifreeze activities in pathogenesis and growth of snow molds. *Phytopathology*; 90: 354-361.

THE ANTARCTIC TREATY SYSTEM. (1959). Washington, D. C. Disponível em: <http://www.ats.aq/documents/ats/treaty_original.pdf>. Acesso em 03 abril de 2014.

TOJO, M.; WEST, P. V.; HOSHINO, T.; KIDA, K.; FUJII, H.; HAKODA, A.; KAWAGUCHI, Y.; MÜHLHAUSER, H. A.; VAN DE BERG, A. H.; KÜPPER, F. C.; HERRERO, M. L.; KLEMSDAL, S. S.; TRONSMO, A. M.; KANDA, H. (2012). *Pythium polare*, a new heterothallic oomycete causing brown discoloration of *Sanionia uncinata* in the Arctic and Antarctic. *Fungal Biology*; 116 (7): 756-768.

TOSI, S.; CASADO, B.; GERDOL, R.; CARETTA, G. (2002). Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar Biology*; 25 (4): 262-268.

UPSON, R., READ, D. J, NEWSHAM, K. K. (2007). Widespread association between the ericoid mycorrhizal fungus *Rhizoscyphus ericae* and a leafy liverwort in the maritime and sub-Antarctic. *New Phytologist*; 176: 460-471.

VICTORIA, F. C., PEREIRA, A. B. (2007). Índice de valor ecológico (IES) como ferramenta para estudos fitossociológicos e conservação das espécies de musgos na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica Marítima. *Oecologia Brasiliensis*, 11 (1): 50-55.

_____. (2012). Sistema de anéis concêntricos do fungo FIMA 665-5, sobre carpetes do musgo *Sanionia Uncinata* (Hedw.) Loesk, Ilha Rei George, Antártica.. 1 fotografia.

VIEIRA, B. F. (2006). O Tratado da Antártica: Perspectivas Territorialista e Internacionalista. *Cadernos PROLAM/USP*; 2: 49-82.

VISAGIE C.M., HOUBRAKEN J., FRISVAD J.C., HONG, S. B., KLAASSEN, T.C.S., PERRONE, G., SEIFERT, K.A., VARGA, J., YAGUCHI, T., SAMSON, R.A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78: 343-371.

WILLIAMS, P. G., ROSER, D. J., SEPPELT, R. D. (1994). Mycorrhizas of hepatics in continental Antarctica *Mycological Research*; 98: 34-36.

WILSON, J.W. (1951). Observations of concentric 'fairy rings' in arctic moss mat. *Journal Ecology*; 39: 407-416.