

RAQUEL SCHIER GUERRA

**PROSPECÇÃO DAS ESPÉCIES DE FUNGOS NEGROS ASSOCIADOS À
DOENÇA DO CARANGUEJO LETÁRGICO (DCL) NO LITORAL DO ESTADO DA
BAHIA.**

RAQUEL SCHIER GUERRA

**PROSPECÇÃO DAS ESPÉCIES DE FUNGOS NEGROS ASSOCIADOS À
DOENÇA DO CARANGUEJO LETÁRGICO (DCL) NO LITORAL DO ESTADO DA
BAHIA.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná para obtenção do título de Mestre, área de concentração: Microbiologia
Orientação Prof. Walter Boeger.
Co-orientação Prof. Vânia Aparecida Vicente

Curitiba-PR

2010

Dedico à minha mãe

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Walter Boeger pela orientação, dedicação, paciência e pela oportunidade concedida;
- À professora Dra. Vânia Aparecida Vicente pela co-orientação, apoio, incentivo, paciência e estímulos constantes;
- Às professoras Ida Chapaval e Patrícia Dalzoto pelas dicas e considerações na qualificação que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho;
- Ao GIA – Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais pelo auxílio no desenvolvimento desta pesquisa;
- Em especial, ao colega e pesquisador do GIA, Raphael Ribeiro, pela paciência, sugestões e constante colaboração;
- À Universidade Federal do Paraná - Laboratório de Microbiologia do Setor de Biológicas - Departamento de Patologia Básica - pelo auxílio e espaço concedido;
- Aos colegas do laboratório de Microbiologia do Setor de Patologia da UFPR: Ângela, Diogo, Patrícia, Fabiana, os quais contribuíram para o andamento deste trabalho;
- Em especial, Fernanda, Francine, Eduardo e Samarina, pela ajuda e, principalmente, pela amizade e momentos de descontração;
- Aos pesquisadores do GIA, Luciana Patella, Marcus Giroto, Robson Ventura pelas colaborações e em especial ao Ubiratan Silva, pela contribuição prestada na coleta das amostras;
- À minha mãe pelo apoio, paciência e ajuda constante;
- Ao namorado e amigo Otávio Camargo Lobo Neto pelo companheirismo, apoio, incentivo e pela contribuição na elaboração desta dissertação.

RESUMO

Os fungos negros constituem um grupo grande e heterogêneo cuja principal característica é a pigmentação escura (melanina) na parede celular das células vegetativas e reprodutivas. Estes fungos são encontrados na natureza, principalmente no solo e matéria orgânica em decomposição. Entre as infecções causadas por estes fungos, inclui-se micetomas eumicóticos, feohifomicose e cromoblastomicose. Recentemente uma doença emergente conhecida como doença do caranguejo letárgico (DCL), causada por um fungo negro, uma espécie de *Exophiala* sp (CBS 120420), está causando maciças mortalidades nas populações de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) no Brasil. Enquanto, *Cladophialophora* sp detectada, algumas vezes, em caranguejos doentes, é considerada uma espécie oportunista. Caranguejos afetados para DCL apresentam letargia e controle motor reduzido. Amostras de fungos negros foram isolados de microhabitats distintos de regiões de manguezais expostos à mortalidades pela DCL (áreas do estado da Bahia) na procura pelas espécies associadas na doença. Marcadores moleculares específicos, Salm F5 e Salm R3 e Clado F2 e Clado R2, foram utilizados para identificar o fungo causador da DCL, *Exophiala* sp, e o fungo oportunista *Cladophialophora* sp, respectivamente. Todos os isolados de fungos negros (119) resultaram em reações negativas para o marcador molecular para o fungo causador DCL. Entretanto, 10 isolados resultaram reações positivas para o marcador molecular para o fungo oportunista, *Cladophialophora* sp. Essas amostras positivas foram isoladas de folhas da árvore (Canavieiras-controle e Acupi-fazenda), galho (Canavieiras controle e Acupi-fazenda) e raiz aérea (Canavieiras controle). Todas as amostras mostraram compatibilidade com a micromorfologia de *Cladophialophora* sp. Sequências ITS desses isolados positivos mostraram similaridade nucleotídica com linhagens depositadas no Genbank, as quais foram obtidas de solo da cidade de Colombo (Paraná-Brasil) e de doença disseminada ocorrida nos EUA. O resultado rejeita a hipótese que a proximidade de fazendas de carcinocultura pode aumentar a possibilidade de surtos de DCL em populações de caranguejo nos manguezais

Palavras-chave: fungo negro; doença do caranguejo letárgico (DCL); *Exophiala* sp; *Cladophialophora* sp

ABSTRACT

The black fungi represent a large and heterogeneous cluster of species which share a dark-pigmented cell wall (melanin) of the vegetative and reproductive cells. These fungi are found in nature, mainly in the soil and in the decomposing organic matter. Among the main fungal diseases caused by these agents are the eumycotic phaeophycomycosis and chomoblasthomycosis, which occur by the traumatic implantation of the fungus in the host tissue. Recently, an emerging disease known as Lethargic Crab Disease (LCD), caused by a black fungus, a species of *Exophiala* (CBS 120420), is causing massive mortalities in populations of the mangrove land crab (*Ucides cordatus*) in Brazil. While *Cladophialophora* sp is also often detected in sick crabs, it has been considered an opportunistic species. Crabs affected by LCD show lethargy and poor motor control. Samples of black fungi were isolated from distinct microhabitats of mangrove regions, exposed and non-exposed to mortalities by LCD (several areas in the State of Bahia) in search of fungi species associated to the disease. Specific molecular markers, Salm F5 and Salm R3, Clado F2 and Clado R2, were used to identify fungi related to the disease of the Lethargic Crab Disease, *Exophiala* sp, and the opportunistic fungi *Cladophialophora* sp, respectively. All black fungi isolated (119) resulted in negative reactions with molecular markers targeting the fungi that causes the LCD. However, for the region of Bahia, 10 isolates resulted in positive reactions for the molecular markers of *Cladophialophora* sp. These positive samples were isolated from tree leaves (Canavieiras-control and Acupi-farm), wood (Canavieiras-control and Acupi-farm), and aerial root (Canavieiras-control). All positive samples showed compatibility with the morphology of the *Cladophialophora* sp. ITS sequences of these positive isolates showed nucleotide similarity to a strain of species from soil of Colombo city (Paraná-Brazil) and one isolate showed higher similarity with a sample obtained from a disseminated infection occurred in EUA. The result rejects the hypothesis that proximity of shrimp farms may enhance the probability of LCD outbreaks in mangrove land crab populations.

Key-words: black fungi; lethargic crab disease (LCD); *Exophiala* sp; *Cladophialophora* sp

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 IDENTIFICAÇÃO E TAXONOMIA DE FUNGOS NEGROS	
HERPOTHRICHIELLACEOS	13
3.2 FUNGOS NEGROS HERPOTHRICHIELLACEOS PATOGÊNICOS DE ANIMAIS	
.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 ÁREAS DE COLETA	19
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS	21
4.3 ISOLAMENTO	22
4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS	23
4.4.1 Extração de DNA.....	23
4.4.2 PCR diagnóstica de <i>Exophiala</i> sp, agente da DCL	23
4.4.3 PCR diagnóstica para <i>Cladophialophora</i> sp.....	24
4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS POSITIVOS	25
4.5.1 Ribotipagem	25
4.5.2 Sequenciamento.....	25
4.6 CARACTERIZAÇÃO MICROMORFOLÓGICA DOS ISOLADOS POSITIVOS ..	26
4.7 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS E RELACIONAMENTO FILOGENÉTICO	27
5 RESULTADOS	27
5.1 ISOLAMENTO	27
5.2 PCR DIAGNÓSTICA DOS FUNGOS NEGROS ASSOCIADOS À DCL	29
5.3 SEQUENCIAMENTO E FILOGENIA	30
5.4 MICROMORFOLOGIA DOS ISOLADOS POSITIVOS	33
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Desde 1997, uma doença vem promovendo mortandades nas populações de caranguejo-uçá na costa Nordeste do país e no estado do Espírito Santo. Durante eventos de mortandades, os caranguejos apresentam diversos sinais clínicos em comum, tais como letargia, controle motor reduzido e tetania. Assim, essa enfermidade foi denominada por Boeger, Ostrensky e Patella (2005) como Doença do Caranguejo Letárgico (DCL).

Popularmente conhecido no Brasil como caranguejo-uçá, catanhão, caranguejo do mangue ou caranguejo-verdadeiro, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) é encontrado exclusivamente em manguezais, regiões influenciadas pelas marés, localizados na costa atlântica do continente americano, desde a Flórida (Estados Unidos) até Santa Catarina (Brasil). Considerado o maior de sua família (Ocypodidae), sua alimentação está baseada, em sua maioria, em substratos de origem vegetal, tais como: folhas de mangue, material vegetal, galhos, sedimentos, cascas e, em menor porcentagem, material animal, como crustáceos, poliquetos, insetos, bivalves e gastrópodes (NORDHAUS; WOLF, 2007).

O caranguejo-uçá tem grande importância ambiental, pois contribui para ciclagem de nutrientes no ecossistema manguezal através da aeração e descompactação dos solos pela construção de tocas com uma profundidade máxima de 2 metros promovendo, portanto, a oxigenação das camadas mais profundas de sedimento. A degradação de folhas dentro de tocas, realizada pelo caranguejo-uçá, é cerca de 2,4 vezes mais rápida que a ocorrida na superfície do solo (CASTILHO, 2006). Adicionalmente, é considerado um importante bioindicador de áreas críticas por sua sensibilidade a diversos poluentes, tal como contaminação por petróleo (NUDI *et al.*, 2007).

Dentre as extrações de recursos naturais de manguezais, a captura desta espécie de caranguejo é considerada a atividade econômica mais importante conduzida em escala comercial no Brasil sendo, muitas vezes, a única fonte de renda familiar das populações litorâneas (CASTILHO, 2006). A DCL pode reduzir significativamente a captura comercial desta espécie de caranguejo, como observado nos manguezais da Paraíba e Bahia (ALVES; NISCHIDA, 2003; SCHIMDT, 2006).

Atualmente, a doença encontra-se em expansão, especialmente no sentido norte-sul e, segundo últimos relatos, a doença já atingiu os estoques de caranguejo-uçá no litoral do estado do Espírito Santo.

Schaeffer-Novelli *et al* (2004), através de evidências circunstanciais, relatam que as mortandades de caranguejo-uçá no Nordeste do Brasil tem origem relacionada à fazendas de carcinocultura, pois estaria associada à enfermidades virais que afetam camarões de cultivo, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), espécie utilizada em mais de 95% dos cultivos do Brasil.

Entretanto, Boeger, Ostrensky e Patella (2005) através da análise histopatológica dos caranguejos classificados como moribundos demonstrou que a maioria apresentavam uma profusão de células leveduriformes e hifas acastanhadas na maioria dos órgãos e tecidos, especialmente no coração, gânglio torácico e na hemolinfa (Figura 1).

A análise dos tecidos dos caranguejos enfermos recuperaram dois gêneros de ascomicetos herpothrichiellaceos, *Exophiala* sp (CBS 120420) e *Cladophialophora* sp conhecidos como fungos negros ou leveduras negras. Evidências experimentais e moleculares sugerem que *Exophiala* sp é o agente responsável pela DCL e que *Cladophialophora* sp, que foi encontrada em folhas em decomposição nos estuários analisados é, portanto, considerada uma espécie oportunista, que se torna invasiva quando o caranguejo torna-se enfraquecido por *Exophiala* sp (BOEGER; VICENTE, 2006; RIBEIRO, 2008). Entretanto, como trata-se de uma nova espécie de *Exophiala*, atualmente, esforços estão sendo concentrados na sua descrição e no entendimento do seu nicho ambiental.

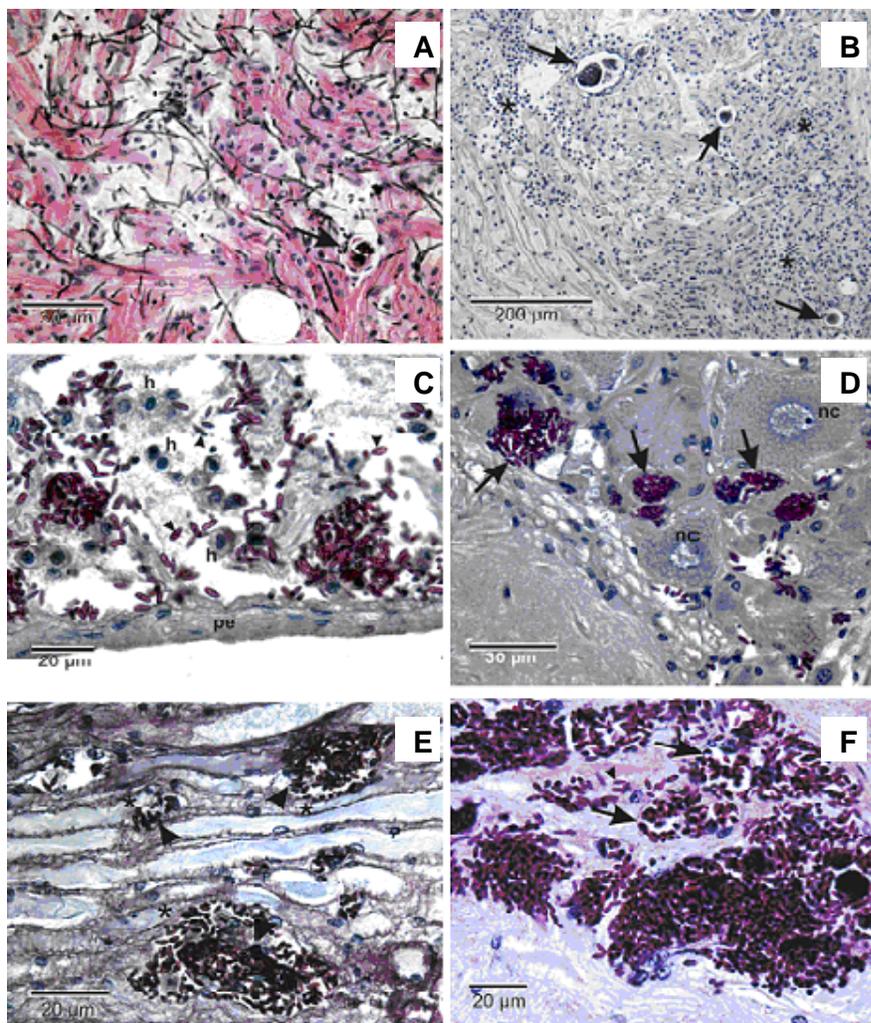


Figura 1 - Micrografia de corte histológico dos tecidos de um caranguejo enfermo pela DCL.

Legenda: A e C: tecido cardíaco afetado pela DCL; B: tecido cardíaco saudável; D, E e F (gânglio torácico, fibras nervosas, gânglio nervoso, respectivamente) afetados pela DCL

FONTE: BOEGER *et al* (2007).

Através da comparação da sequência do fungo causador da doença e do agente oportunista, com sequências de espécies proximamente relacionadas, foram sintetizados iniciadores específicos para o diagnóstico da DCL, bem como para o diagnóstico do fungo oportunista na doença, os quais visam a amplificação de um fragmento específico do DNAr, inserido na região ITS. Testes de sensibilidade mostraram que este conjunto de iniciadores para ambos são extremamente sensíveis e, portanto, específicos (GIA, 2005).

Análise epidemiológica realizada no Litoral de Sergipe evidenciou que em períodos intermediários às mortandades (inverno) os fungos foram detectados em 2% dos caranguejos, os quais se apresentavam assintomáticos. Ou seja, a presença do agente patogênico ao longo do ano não é suficiente para provocar a mortandade massiva de animais e, portanto, a explicação para a periodicidade dos eventos de mortandade parece residir no equilíbrio entre resistência e virulência. Contudo, sugere-se que a DCL comporta-se como enfermidades com a dinâmica conhecida como suscetíveis-infectados recuperados (SIR), ou seja, oscilações na incidência de enfermidades podem ser determinadas por uma imunidade prolongada subsequente às infecções. Ciclos ocorrem, pois períodos de grandes epidemias extinguem-se através da eliminação do estoque de organismos suscetíveis. O número de organismos nos grupos dos suscetíveis cresce gradualmente, eventualmente até uma proporção suficientemente grande a permitir outros grandes eventos epidêmicos da enfermidade (BOEGER; PIE, 2006)

Estes dados foram utilizados para desenvolver um modelo matemático desenvolvido para descrever a transmissão da DCL dentro do sistema manguezal, o qual captura as principais características da enfermidade. Os resultados são apresentados em termos de número caranguejos capazes de gerar descendentes, população de fungos, bem como taxa de transmissão. O modelo prevê oscilações relacionadas com parâmetros demográficos e epidemiológicos, bem como taxas de restabelecimento de susceptíveis, infectividade, recuperação e mortalidade (FERREIRA *et al.*, 2009).

O isolamento do agente dessa patologia em regiões do litoral brasileiro incluindo áreas endêmicas podem auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da infecção, contribuir para o entendimento da sua possível rota e da origem da linhagem patogênica da DCL, bem como a dinâmica desta enfermidade no litoral brasileiro.

2 OBJETIVOS

- Avaliar, através do isolamento de fungos negros dos diferentes substratos vegetais e solo de manguezais e aplicação de marcadores moleculares específicos, se a presença do fungo negro causador da Doença do Caranguejo Letárgico está associada à existência de fazendas de carcinocultura no litoral do estado da Bahia
- Caracterizar os isolados positivos através de sequenciamento;
- Avaliar em que compartimento ambiental se encontram os fungos associados à DCL.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 IDENTIFICAÇÃO E TAXONOMIA DE FUNGOS NEGROS HERPOTHRICHIELLACEOS

Os fungos negros constituem um grupo grande e heterogêneo cuja principal característica, devido à presença da melanina, é a pigmentação escura na parede celular das células vegetativas e reprodutivas (DIXON; POLAK-WISS, 1991). Já o termo leveduras negras é utilizado para definir fungos potencialmente capazes de produzir células melanizadas, através de crescimento unicelular (fase leveduriforme), em qualquer estágio do seu ciclo de vida, o qual depende do nicho ecológico em que habita (DE HOOG; GENE; FIGUERAS, 2004; DE HOOG, 1993), condição que ocorre em diversos fungos, tais como em alguns Basidiomicetes e membros Ascomicetes das ordens Chaetothyriales e Dothideales (DE HOOG *et al.*, 2000).

Na natureza, substratos vegetais, madeira, solo e cobertura vegetal em decomposição são adequados para isolamento de fungos negros (DIXON; SHADOMY; SHADOMY, 1980; IWATSU; MIYAJI; OKMOTO, 1981; VICENTE, 2000), bem como solo contaminado com hidrocarbonetos (SATOW *et al.*, 2008). Estes fungos distribuem-se em regiões de clima tropical e subtropical (VICENTE, 2000), ambientes semi-áridos e desertos quentes (STERFLINGER, 2006), bem como em solo de geleiras (BRIDGE; NEWSHAM, 2009).

Embora existam muitas diferenças entre os inúmeros habitats das leveduras negras, todos apresentam algumas condições especiais tais como pouca disponibilidade de nutrientes, presença de compostos aromáticos, elevadas temperaturas, radiação ultravioleta (UV), estresse osmótico ou combinações desses fatores (STERFLINGER, 2006). A determinação de espécies desse grupo de fungos ocorre primeiramente com a observação da estrutura macroscópica da colônia, a qual apresenta desenvolvimento caracterizado pelo aspecto escuro (marrom, verde oliva ou negro) e, microscopicamente, hifas com septos escuros (DE HOOG *et al.*, 2000).

Nos Ascomycetes ordem Chaetothyriales, sobretudo compreendendo a família Herpotrichiellaceae, *Exophiala* é o anamorfo mais comumente encontrado, apresentando na maioria das vezes colônias preto-oliváceo, reduzidas, viscosas no centro, característica de crescimento leveduriforme, e margens lisas. Mais tarde, frequentemente tornam-se aveludadas ou lanosas. Microscopicamente apresentam células intercaladas, cilíndricas livres, com forma de cantil ou acicular com estreitamento relativo, pequenas ou muito pequenas zonas de anelamento. Conídios formados com cabeças sub-hialinas, parede lisa (1-4 células). Algumas cadeias com células esféricas são formadas com profusão de brotos. Cadeias com células em forma de cantil podem estar presentes (DE HOOG; GENE; FIGUERAS, 2004).

Espécies de *Cladophialophora* apresentam colônias restritas, pulverulentas à lanosas, verde-acinzentado à verde-oliváceo. Conidióforos ausentes ou imperceptíveis. Conídio de uma célula, seco, decorrentes em aparecimento, pouco ramificado, frequentemente com cadeias coerentes, com ou sem ramoconídio; cicatrizes conidiais quase despigmentadas (DE HOOG; GENE; FIGUERAS, 2004).

A plasticidade morfológica das espécies de fungos negros e a pouca diferenciação das estruturas conidiais, com possíveis variações de tamanho e formato na maioria das espécies, dificultam a determinação de espécie através da análise morfológica. Assim, métodos de biologia molecular são empregados para tal. Para fungos utiliza-se a técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR) visando a amplificação de fragmentos específicos do DNA ribossomal (DNAr), caracteristicamente repetitivo, situado em regiões específicas do genoma e presente em altas proporções em relação ao conteúdo total de DNA da espécie (HILLIS;

DIXON, 1991; CALIGIORNE *et al*, 1999; HAYNES *et al*, 1995; VICENTE, 2000; DE HOOG *et al*, 2006; SATOW *et al*, 2008).

O DNAr contém repetições que são separadas por regiões não transcritas, regiões 18S, 5.8S e 28S, que geralmente não apresentam variação de seqüência; e regiões internas que apresentam variações na seqüência e são transcritas (ITS 1 e ITS 2). Assim, dados oriundos de sequenciamento da região ITS têm sido utilizados para estudos de filogenia e evolução, bem como para identificação e descoberta de novas espécies (SPATAFORA; MITCHELL; VILGALYS, 1995; DE HOOG *et al.*, 1998; UNTEREINER; NAVEAU, 1999; GUARRO; GENE; STCHIGEL, 1999; DE HOOG *et al*, 2000; VICENTE, 2000; MATOS *et al*, 2003; DE HOOG *et al.*, 2007; ZENG *et al*, 2007; SATOW *et al*, 2008; BADALI *et al*, 2008; BRIDGE; NEWSHAM, 2009).

Com base no sequenciamento das regiões 18S e ITS do DNAr, *Exophiala* (anamorfo) foram confirmados intimamente relacionados com *Capronia* spp (teleomorfo) (DE HOOG *et al.*, 1998). Tal fato sugere uma conexão previamente proposta (UNTEREINER, 1997 *apud* VICENTE, 2000) entre anamorfos e teleomorfos destes dois gêneros. Revelar futuramente a relação entre anamorfo/teleomorfo poderá ser a chave para as questões relacionadas no estudo desses organismos (DE HOOG *et al.*, 2000).

Entre as infecções micóticas causadas por estes fungos estão os micetomas eumicóticos, a feohifomicose e a cromoblastomicose, as quais podem se manifestar como infecções superficiais, até sistêmicas, em diversos hospedeiros animais (MONTERO-GEI, 1970; AL-DOORY, 1983; MCGINNIS, 1983; RIPPON, 1988). No caso da DCL, a análise histopatológica dos tecidos dos caranguejos enfermos demonstrou uma profusão de células leveduriformes e hifas acastanhadas na maioria dos órgãos e tecidos, especialmente no coração, gânglio torácico e na hemolinfa, apresentando, portanto, um quadro de feohifomicose sistêmica (BOEGER, OSTRENSKY; PATELLA, 2005)

O termo feohifomicose abrange um amplo espectro de micoses oportunistas causadas por fungos negros Chaetothyriales que ocorrem desde a forma superficial, sub-cutânea até sistêmica. Estima-se que mais de 100 espécies desse grupo de fungos podem causar a doença. Essas espécies podem apresentar-se nos tecidos lesados como células leveduriformes, pseudohifas, hifas verdadeiras ou qualquer

combinação destas formas, mas sem a formação de corpos muriformes (McGINNIS, 1992). Os principais agentes etiológicos de feohifomicoses são espécies de *Exophiala*, destacando-se *E. jeanselmei* (Langeron) McGinnis & Padhye, *E. dermatitidis* (Kano) De Hoog, *E. salmonis* Carmichael, *E. pisciphila* McGinnis e Ajello e *E. spinifera* (Nielsen & Conant) McGinnis. Outros agentes etiológicos conhecidos são *Aureobasidium pullulans*, *Cladophialophora arxii* Tintelnot, *C. boppi* (Borelli) De Hoog *et al*, *C. devriesii*, *Alternaria alternata*, *Curvularia* spp, *Phialophora* spp (AJELLO, 1978; VICENTE, 2000).

Já a cromoblastomicose é resultado da implantação traumática desses agentes no hospedeiro caracterizando uma infecção sub-cutânea com formação de corpos septados nos tecidos denominados de muriformes. O corpo muriforme tem a forma de estruturas globosas de parede espessa e acastanhadas os quais se multiplicam pela formação de septos em dois ou mais planos. A cromoblastomicose é uma infecção crônica, fibrosante, de longa evolução, predominantemente localizada nos membros inferiores. Apresenta distribuição mundial, mas a maioria dos casos concentra-se nas regiões tropicais e subtropicais. *Fonsecaea pedrosoi* (Brumpt) Negroni, *F. compacta* Carrión, *Cladophialophora carrioni* (Trejos) De Hoog *et al*, *Phialophora verrucosa* Medlar e *Rinocladiella aquaspersa* (Borelli) Schell *et al* são classicamente envolvidas na etiologia da doença (VICENTE, 2000).

3.2 FUNGOS NEGROS HERPOTHRICHIELLACEOS PATOGÊNICOS DE ANIMAIS

Exophiala inclui espécies patogênicas e sapróbias isoladas de madeira, água poluída e solo (DE HOOG; GENE; FIGUERAS, 2004). São encontradas causando infecção subcutânea, feohifomicose subcutânea, queratite, pneumonia, sinusite até feohifomicose sistêmica, a qual freqüentemente é fatal. Espécies tais como *E. salmonis* e *E. pisciphila* são isoladas em águas salgadas (DE HOOG; HAASE, 1993) e encontradas como patógenos em várias espécies de peixes, bem como causando feohifomicose em tartarugas, no caso de *E. salmonis* (DE HOOG; GENE; FIGUERAS, 2004).

Dover *et al* (2007) demonstrou que mexilhões de uma passagem hidrotermal do fundo do mar na Bacia de Fiji, na Nova Zelândia, estavam infectados com uma levedura negra identificada como *Capronia* sp, fase teleomórfica de *Exophiala*, a qual provoca uma intensa resposta imune no animal, somente neste grupo de mexilhões, não sendo encontrado na mesma espécie coletada na bacia vizinha.

As espécies de *Exophiala* têm sido descritas como agentes causais de enfermidades em peixes teleósteos e cartilaginosos, os quais clinicamente apresentam-se escuros, letárgicos, com nódulos dermais e granulomas em órgãos viscerais (VICENTE, 2000). *Exophiala salmonis* causa infecção no salmão do Atlântico (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) (OTIS; WOLKE, 1985; RICHARDS HOLLIMAN; HELGASON, 1978) e em trutas (*Oncorhynchus clarkii* Richardson, 1836) (CARMICHAEL, 1967). *Exophiala pisciphila* foi encontrada em bagres (*Ictalurus punctatus* Rafinesque, 1818) (McGINNIS; AJELLO, 1974), em cação liso (*Mustelus canis* Mitchill, 1815) (GASKINS; CHEUNG, 1986) e em associação com *Exophiala* spp no peixe australiano (Witting do rio George, *Sillaginodes punctata* Cuvier, 1829) (REUTER *et al.*, 2003). Uma nova espécie deste gênero foi encontrada causando ulceração e erosão na superfície da pele de linguado japonês (Temminck & Schlegel, 1846) (KURATA *et al.*, 2008). Igualmente, *Exophiala werneckii*, conhecida como saprófita halofítica, foi recuperada como contaminante em peixe salgado da Amazônia (*Osteoglossum bicirrhosum* Vandelli, 1829) (MOK *et al.*, 2007). Recentemente, uma espécie nova de *Exophiala* foi isolada de um quadro de feohifomicose disseminada em peixes marinhos cativos da família Syngnathidae, peixes com mandíbulas fundidas, tais como cavalos-marinhos (NYAOKE *et al.*, 2009).

Nyaoke *et al* (2009) presume que a porta de entrada, neste caso, podem ser as brânquias ou pele através de inoculação traumática ou de uma segunda inoculação por lesões preexistentes com subsequente disseminação hematogênica para órgãos viscerais. Outra porta de entrada à considerar poderia ser a ingestão direta de fungos associados aos detritos. Todavia, a ausência de formação de granuloma ou de reação inflamatória significativa do hospedeiro à *Exophiala* spp podem ser resultantes de resposta imune deficiente ou inadequada. Os mesmos autores sugeriram que a infecção por *Exophiala* spp isolada de peixes cativos da família Syngnathidae, mencionados anteriormente, é espécie-específica, tendo em

vista que outras espécies na mesma situação não morreram. Espécies de fungos negros psicotolerantes e aquáticos da ordem Chaethyriales mostram predileções para diferentes hospedeiros. Este fato é corroborado por De Hoog (1993), que sugeriu que os membros de Herpotrichiellaceae escolhem substratos específicos, devido à sua baixa habilidade competitiva e ao potencial patogênico da espécie, o qual em parte, pode ser determinado pelo seu nicho ecológico natural.

Espécies de *Cladophialophora* são reconhecidos fitopatógenos, endofíticos e sapróbios ambientais (CROUS *et al.*, 2007), ocorrendo em material vegetal, troncos de árvores, madeira e material vegetal em decomposição, solo e solos poluídos com hidrocarbonetos de petróleo (CROUS *et al.*, 2007; BADALI *et al.*, 2008; MARQUES *et al.*, 2006; VICENTE, 2000; YONEZAWA *et al.*, 2004; NARISAWA *et al.*, 2007; PRENAFETA-BOLDÚ *et al.*, 2006).

A maioria das *Cladophialophora*, exceto poucas espécies tal como *C. minourae* (Iwatsu) Haase & De Hoog, conhecido como sapróbio, têm forte tendência à patogenicidade humana e quase todas as espécies tem sido encontradas em infecções variando entre lesões cutâneas leves à encefalite fatal (DE HOOG; GENE; FIGUERAS, 2004). Por exemplo, *C. bantiana* (Saccardo) De Hoog *et al* e *C. modesta* McGinnis *et al* causam infecções cerebrais, *C. devriesii* e *C. arxii* doença disseminada e *C.boppii*, *C. emmonsii* (Padhye *et al*) De Hoog & Padhye e *C.saturnica* Badali infecções cutâneas. *Cladophialophora carrionii*, principal agente da cromoblastomicose, cresce em detritos de espinhos de cactos ricos em tanino, o qual serve de veículo de introdução no corpo humano.

As leveduras negras mostram adaptações para uma variedade de condições ambientais. Fatores ecologicamente significativos incluem a presença de melanina e caroteno, formação de paredes celulares espessas, parede celular e crescimento meristemático, presença de fase leveduriforme, presença de formas adicionais de conidiogênese, termo e osmotolerância, adesão, hidrofobicidade, produção de polissacarídeos extracelulares e metabolitos ácidos ou alcalinos (DE HOOG, 1993).

Gunde-Cimerman *et al* (2006) demonstraram que as leveduras negras são halotolerantes e tem vantagens seletivas em relação a outros fungos, tendo em vista sua preferência por meio ambiente salino, onde são capazes de sobreviver e propagar. Ribeiro (2008) avaliou a tolerância da *Exophiala* sp causadora da DCL a salinidades elevadas por diversos períodos de tempo (1 hora, 1 dia, 1 semana)

através de um modelo experimental baseado em bioensaios *in vitro*, simulando assim, uma hipótese de dispersão da enfermidade em ambientes naturais, o qual demonstrou uma notável halotolerância ao reproduzir-se durante longo período de exposição (1 semana) ao estresse osmótico de uma elevada salinidade marinha (38 ppm). Nieves-Rivera (2005) através de uma prospecção de fungos em manguezais de Porto Rico detectou na espuma da água marinha presença da levedura negra *Exophiala werneckii*, filogeneticamente próxima ao agente etiológico da DCL. Schmidt (2006) estudando os efeitos de um dos eventos de DCL sob caranguejos *U. cordatus* no Sul da Bahia (Caravelas), ao observar que os caranguejos localizados em zonas mais inundadas sofreram uma maior redução na densidade populacional, sugere que o agente etiológico da DCL pode estar associado à água.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREAS DE COLETA

Neste trabalho foram estudados isolados de fungos negros obtidos de manguezais do litoral do Estado da Bahia, em Acupi, Saubara e Canavieiras (Tabela 1, Figuras 2 e 3).

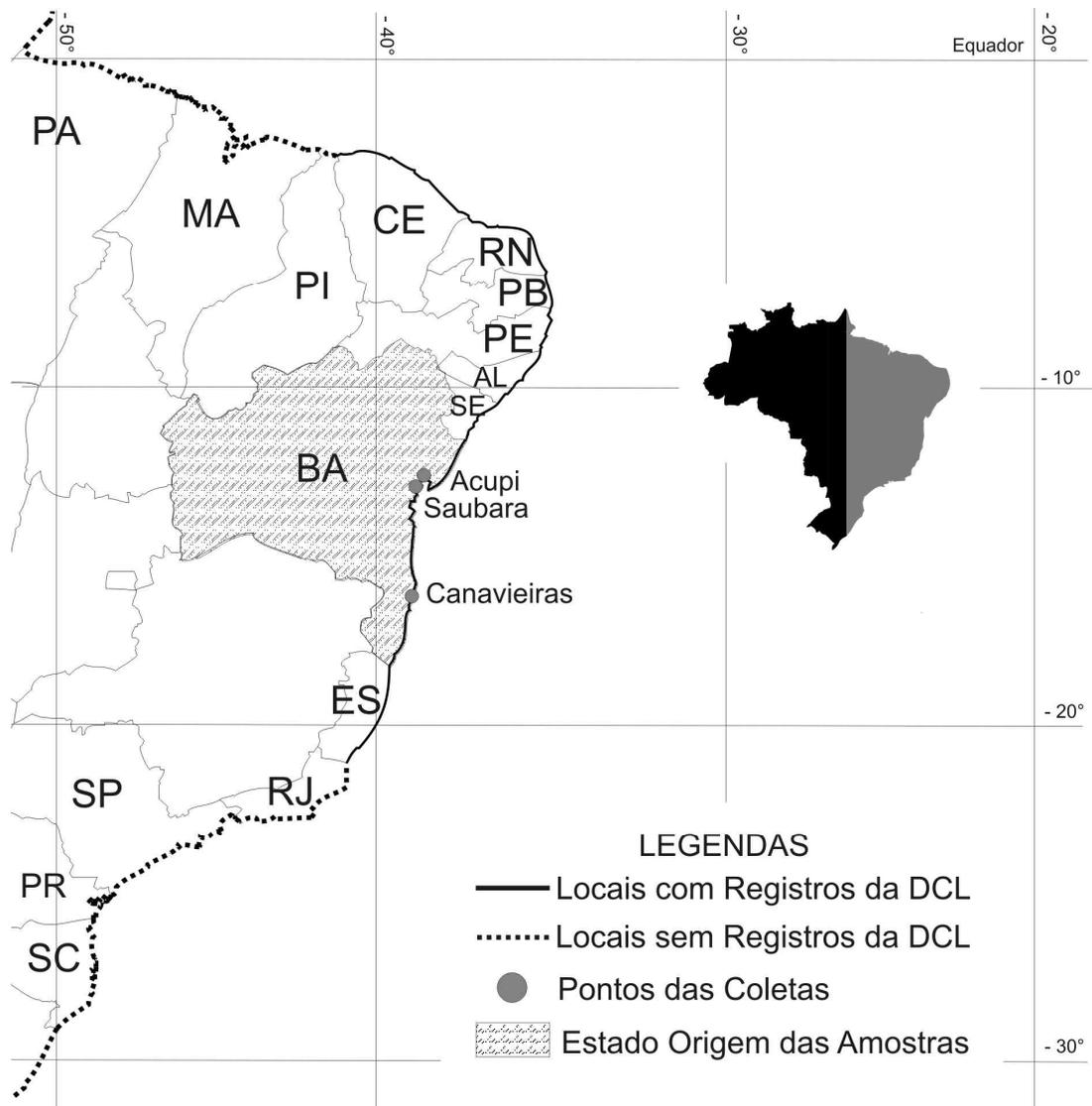


Figura 2 - Locais de coleta do litoral do Estado da Bahia. FONTE: O autor (2010)

TABELA 1: COORDENADAS DAS ÁREAS DE COLETA DO LITORAL DO ESTADO DA BAHIA

Localidade	Coordenadas
Acupi - fazenda	12° 40' 29.5" 38° 44' 97"
Saubara - controle	12° 43' 59.08" 38° 45' 12.21"
Canavieiras - fazenda	15° 35' 43.4" 38° 57' 26"
Canavieiras - controle	15° 40' 34" 38° 56' 22.2"

O Estado da Bahia possui um litoral de 188 km representando 13,2% da costa brasileira, o qual apresenta grande número de estuários, cujas bordas caracterizam-se pela formação de mangues arbóreos (LOPES; OLIVEIRA-SILVA; FERREIRA-MELO, 1998).



FIGURA 3 - Manguezais do Estado da Bahia onde ocorreram as coletas.

FONTE: O autor (2008)

A: Acupi-fazenda; B: Saubara-controle; C: Canavieiras-fazenda; D: Canavieiras-controle

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As coletas das amostras foram realizadas em setembro de 2008, período pós mortandade, em manguezais expostos diretamente à matéria orgânica gerada por fazendas de cultivo de camarões marinhos (áreas adjacentes a comportas de saída dos viveiros que drenam diretamente no manguezal) (Acupi-fazenda e

Canavieiras-fazenda) e em áreas afastadas das fazendas, os quais foram designados de controle, pois nessas regiões, apesar de submetidas às mortandades, não estão sob influência das fazendas de carcinocultura (Saubara-controle e Canavieiras-controle). Nesses locais, foram coletadas: folhas das árvores e folhas do chão, solo (superfície), galhos, raízes aéreas e solo do interior das tocas de caranguejo-uçá, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos individuais e transportadas sob refrigeração até o momento da análise.

4.3 ISOLAMENTO

Para o procedimento de isolamento foi utilizada a técnica de flotação em óleo conforme metodologia baseada de Vicente (2001). Conforme esse protocolo, de cada amostra de material coletado, 20g foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente em erlenmeyers com 100 mL de solução salina esterilizada contendo 200 unidades de penicilina, 200µg/mL de estreptomicina, 200µg/mL de cloranfenicol e 500µg/mL de ciclohexamida. Em seguida foi acrescentado 20 mL de óleo mineral em cada erlenmeyer. A solução foi homogeneizada por agitação durante 5 minutos e mantida em repouso durante 20 minutos. Em seguida, a interfase da suspensão foi coletada e inoculada em 5 placas contendo Ágar Mycosel (HIMEDIA), a qual foi distribuída na superfície do meio sólido com auxílio da alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 30°C durante 4 semanas e após o crescimento das colônias de coloração escura, observadas macroscopicamente, estas foram repicadas em Ágar Saboraud Dextrosado. Após a purificação dos isolados, estes foram transferidos para tubos contendo meio inclinado de Agar Saboraud Dextrosado, os quais foram incubados à 30°C até o crescimento da cultura e, posteriormente, depositados na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro), Departamento de Patologia Básica.

4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

4.4.1 Extração de DNA

Foi coletado, aproximadamente, 1 cm² de micélio cultivado em Agar Sabouraud Dextrosado transferindo-se para microtubo contendo 300 µL de tampão CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) com sílica em pó (sílica gel Merck/celite 2:1). O material foi triturado com bastão de vidro esterilizado durante 1 a 2 minutos. Após a trituração, acrescentou-se 200 µL de tampão CTAB, agitando e incubando por 10 minutos a 65°C. Após a incubação foi adicionado 500 µL de clorofórmio obtendo-se as fases (orgânica e aquosa), as quais foram misturadas cuidadosamente. Realizou-se a centrifugação a 12000 rpm durante 7 minutos e novamente foi adicionado 500 µL de clorofórmio. A fase aquosa foi coletada e 2 volumes de etanol 96% gelado foram acrescentados e a precipitação do DNA realizada a -20°C “overnight”. Após a precipitação do DNA, procedeu-se a centrifugação a 12000 rpm por 7 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o pellet lavado com álcool 70% gelado centrifugando-se por 1 minuto e os tubos vertidos até a secagem completa do pellet a temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em 100 µL de água ultra-pura (Adaptado por VICENTE, 2000). A concentração e pureza do DNA foram mensurados por espectrofotometria com base na relação de absorbância a 260 e 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀).

4.4.2 PCR diagnóstica de *Exophiala* sp, agente da DCL

Os DNAs extraídos foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de um fragmento específico do DNAr, inserido na região ITS, que foram amplificados com o uso dos pares de iniciadores Salm F5 (5'CCCTCTGGCCCGCGCTCGTCGACAGC3') e Salm R3 (5'GAGAAAGATTCTCCCTGAGGGGAGGCAG3') (GIA, 2005) (Figura 4). As reações

de amplificação (25 µL) foram preparadas com 50 ng de DNA, 3 mM de MgCl, 0,4mM de solução de dNTPs, 1x de solução tampão, 0,1 U de Taq Polimerase Platinum (Invitrogen), 2 pmoles de cada iniciador.

O programa utilizado apresentou 25 ciclos: 5 minutos a 94°C (desnaturação inicial), 40 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 70,5°C (anelamento) e 30 segundos a 72°C (síntese) e 2 minutos a 72°C (extensão final). Os produtos de amplificação por PCR foram utilizados para a avaliação da reação através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, seguida de coloração por brometo de etídio. A amostra processada foi considerada positiva quando a aplicação do marcador resultou em uma banda de tamanho idêntico ao do extrato controle do fungo da DCL (432 pares de base).

4.4.3 PCR diagnóstica para *Cladophialophora* sp

Os DNAs extraídos foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de um fragmento específico do DNAr, inserido na região ITS, que foram amplificados com o uso dos pares de iniciadores Clado F2 (5´ACCTCTGTTGCTTCGGCGGACCCGTC3´) e Clado R2 (5´TAGGAGGGGTAGAGACTCTACCAAGCC3´) (GIA, 2005) (Figura 4). As reações de amplificação (25 µL) foram preparadas com 100 ng de DNA, 3 mM de MgCl, 0,4mM de solução de dNTPs, 1x de solução tampão, 0,1 U de Taq Polimerase Platinum (Invitrogen), 2 pmoles de cada iniciador. O programa utilizado apresentou 25 ciclos: 5 minutos a 95°C (desnaturação inicial), 40 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 67°C (anelamento) e 30 segundos a 72°C (síntese) e 2 minutos a 72°C (extensão final). Os produtos de amplificação por PCR foram utilizados para a avaliação da reação através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, seguida de coloração por brometo de etídio.

A amostra processada foi considerada positiva quando a aplicação do marcador resultou em uma banda de tamanho idêntico ao do extrato controle do fungo oportunista da DCL (372 pares de base).

4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS POSITIVOS

4.5.1 Ribotipagem

Fragmentos de DNA, das amostras positivas na PCR para *Cladophialophora* sp foram amplificados com o uso dos pares de iniciadores V9G (5'-TTACgTCCCTgCCCTTTgTA-3') e LS266 (5'-gCATTCCCAAACAACCTCgACTC-3') (De Hoog; Gerrits van den Ende, 1998) (Figura 4). As reações de amplificação (25 µL) foram preparadas com 50 ng de DNA, 3 mM de MgCl, 0,4mM de solução de dNTPs, 1x de solução tampão, 0,1 U de Taq Polimerase Platinum (Invitrogen), 2 pmoles de cada iniciador. O programa utilizado apresentou 30 ciclos: 2 minutos a 94°C (desnaturação inicial), 30 segundos a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 65°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (síntese) e 5 minutos a 72°C (extensão final). Os produtos de amplificação por PCR foram utilizados para a avaliação da reação através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, seguida de coloração por brometo de etídio. As amostras amplificadas foram purificadas com PEG 8000 (PEG 8000 30%, NaCl 1,6M).

4.5.2 Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi utilizada apenas para as amostras positivas na PCR para *Cladophialophora* sp. Foram utilizados 0,5µL dos iniciadores ITS 1 (4µM) (5'-TCCgTAggTgAACCTgCgg-3') (White *et al*, 1990) (Figura 4) e ITS 4 (4µM) (5'-TCCTCCgCTTATTgATATgC-3') (White *et al*, 1990) (Figura 4) juntamente com 1 µL da PCR purificada, 0,5µL de Big Dye (2', 3'didesoxirribonucleotídeo trifosfato (ddNTP)) (Applied Biosystems), 0,5 µL de Buffer 5X (Applied Biosystems). O programa utilizado apresentou: 35 ciclos, 1 minuto à 96°C, 10 segundos à 96°C, 5 segundos à 50°C, 4 minutos a 60°C . Os produtos do seqüenciamento foram

purificados com Sephadex (Sigma-Aldrich) e secados em speed vac por 45 minutos à 60°C. Após esta etapa foram transferidos para o sequenciador ABI 3100 automático (Biosystems).

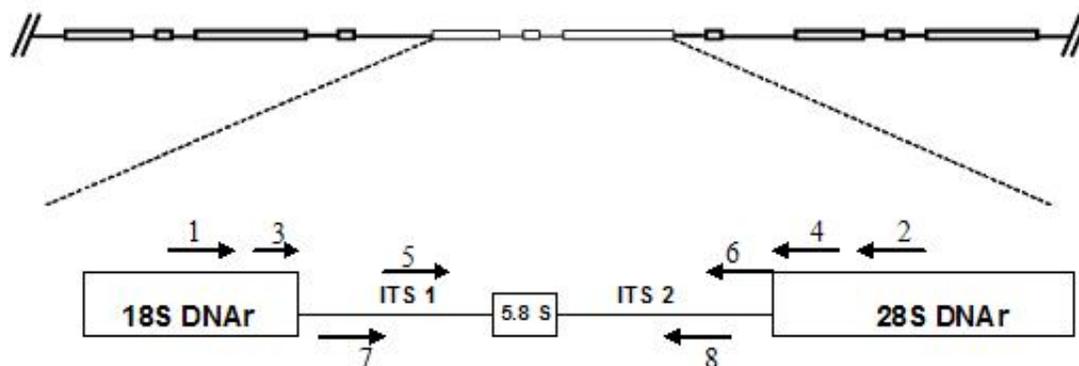


FIGURA 4 - Representação da estrutura do gene DNAr que codifica o RNAr e dos iniciadores aplicados. O conjunto é dividido em regiões codificadoras (18S, 5.8S e 28S) e não codificadoras (ITS1 e ITS 2). A posição aproximada dos iniciadores e suas direções de síntese estão indicadas por setas e pelos números: 1- V9G; 2- LS266; 3- ITS 1; 4- ITS 4; 5- Salm F5; 6-Salm R3; 7- Clado F2; 8- Clado R2.
 FONTE: Adaptado de Ribeiro (2008)

4.6 CARACTERIZAÇÃO MICROMORFOLÓGICA DOS ISOLADOS POSITIVOS

Como critério adicional de identificação dos isolados positivos para *Cladophialophora sp* foi utilizada a técnica de microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999). Foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão. Um cubo de aproximadamente 1 cm³ de meio de cultura Mycosel foi cortado e colocado sobre um lâmina contida no interior da placa. Inoculou-se o isolado em todos os lados do cubo, o qual posteriormente foi coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior foi umedecido com água destilada esterilizada e as placas incubadas em estufa por 10 dias, a aproximadamente 30°C. Após o tempo determinado, a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de Lactofenol de Amann,

sendo as bordas vedadas com esmalte incolor. As lâminas preparadas foram observadas ao microscópio ótico.

4.7 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS E RELACIONAMENTO FILOGENÉTICO

As sequências de nucleotídeos foram processadas com o auxílio do programa BIOEDIT (HALL, 1999) e alinhadas através do uso do programa Clustal W (THOMPSON; HIGGIS; GIBSON, 1994). Os fragmentos obtidos foram submetidos ao “nucleotide-nucleotide” BLAST (blastn) do NCBI – GenBank (National Center for Biotechnology Information of the National Institutes of Health) (BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL (BLAST) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

O relacionamento filogenético dos indivíduos/linhagens isolados foi reconstruído através do programa MrBayes, utilizando o portal CIPRES (www.phylo.org) com 4 cadeias, 5.000.000 de gerações e burnin de 25%.

5 RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO

Tanto nas áreas que sofrem influência direta da matéria orgânica gerada por fazendas de cultivo de camarões marinhos (áreas adjacentes a comportas de saída de viveiros que drenam diretamente no manguezal) (Acupi-fazenda e Canavieiras-fazenda), bem como em áreas afastadas de cultivos (Saubara-controle e Canavieiras-controle), denotaram a ampla distribuição desses agentes nos diferentes substratos analisados (Figura 5). Das 71 amostras analisadas, 36 foram positivas, 50,70% de frequência de amostras positivas para fungos negros. Dentre essas, amostras de galho, obtiveram maior frequência de isolamento (87,5%) (Tabela 2).

TABELA 2 - FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE FUNGOS NEGROS DOS DIFERENTES SUBSTRATOS DOS PONTOS AMOSTRAIS

Regiões	Acupi fazenda	Saúbara controle	Canavieiras fazenda	Canavieiras controle	TOTAL	% Isolamento negros por substrato
Substratos	n° positivos negros / n° amostras					
Folha árvore	2/2	1/2	2/2	1/2	6/8	75
Folha chão	2/2	1/2	1/2	2/2	6/8	75
Galho	2/2	2/2	1/2	2/2	7/8	87,5
Raíz aérea	2/2	1/2	1/2	1/2	5/8	62,5
Solo	2/2	0/2	1/2	2/2	5/8	62,5
Toca	4/5	1/4	0/10	2/5	7/24	29,17
Total por região	14/15	6/14	6/20	10/15	36/64	-
% Isolamento de negros por região	93,33	42,85	30	66,66	56,25	-

FONTE: O autor (2010)

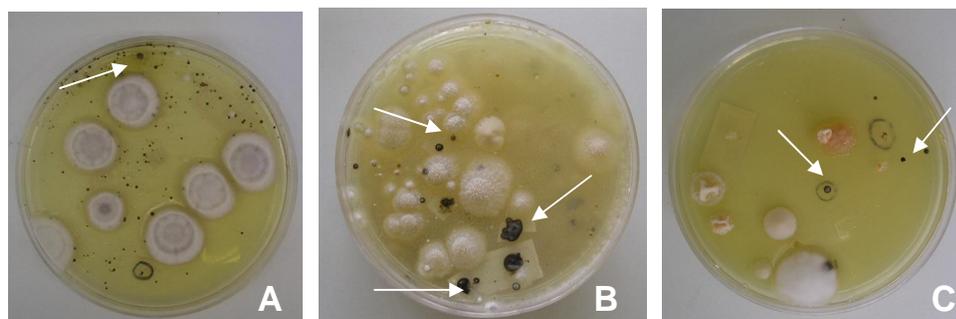


FIGURA 5 - Placas com o isolamento de fungos negros das amostras do litoral do Estado da Bahia - Agar Mycosel (HIMEDIA), 30°C. As setas indicam colônias de fungos negros. A: galho- Canavieiras-controle; B: galho- Canavieiras-controle; C: raíz aérea- Acupi-fazenda. FONTE: O autor (2010)

5.2 PCR DIAGNÓSTICA DOS FUNGOS NEGROS ASSOCIADOS À DCL

Todos os 119 isolados de fungos negros obtidos nesse estudo foram submetidos ao marcador diagnóstico específico para o fungo considerado como agente etiológico da DCL (Figuras 6).

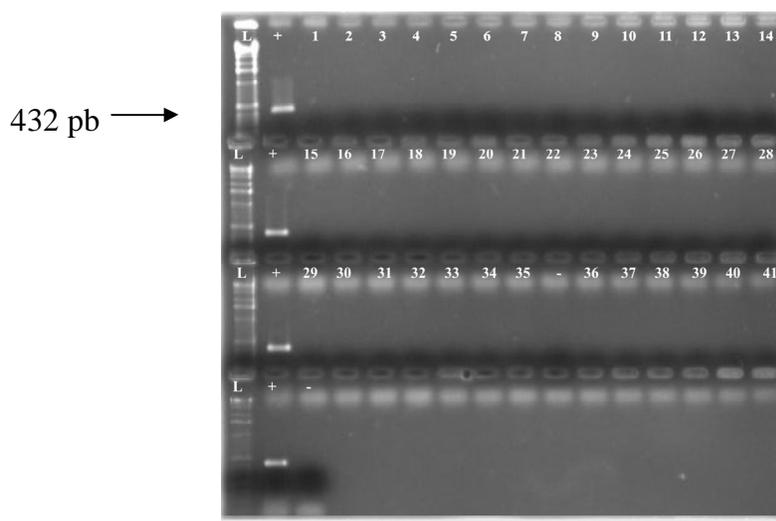


FIGURA 6 - Gel de agarose com a aplicação do marcador molecular específico para *Exophiala* sp (agente da DCL) nos extratos de DNAs dos fungos negros isolados. L. Marcador de peso molecular (DNA ladder -100 pb- Invitrogen). + controle positivo *Exophiala* sp. **1 a 41** extratos de DNAs dos fungos negros isolados do litoral do estado da Bahia. - controle negativo. FONTE: O autor (2009)

Mesmo com grande número de isolados de fungos negros não houve reação positiva para nenhuma das amostras ambientais analisadas com os marcadores específicos para a levedura que causa a DCL.

Os mesmos isolados submetidos ao marcador molecular desenvolvido para *Cladophialophora* sp obteve-se 10 isolados positivos para os seguintes substratos: folha da árvore (Canavieiras controle e Acupi fazenda), galho (Canavieiras controle e Acupi fazenda) e raiz aérea (Canavieiras controle). Amostras positivas foram detectadas tanto em regiões sob influência de fazendas de carcinocultura, bem como nas que não estão sob influência (Figura 7 e Tabela 3).

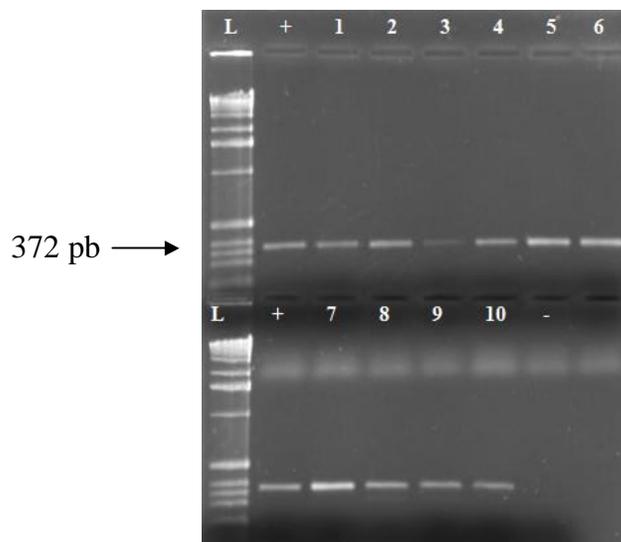


FIGURA 7- Gel de agarose com a aplicação do marcador molecular específico para *Cladophialophora sp* nos extratos de DNAs dos fungos negros. **L.** Marcador de peso molecular (DNA ladder -100 pb- Invitrogen). **+** controle positivo *Cladophialophora cf. devriesii*. **1 a 10** extratos de DNAs dos fungos negros isolados do litoral do estado da Bahia. **-** controle negativo. FONTE: O autor (2009)

5.3 SEQUENCIAMENTO E FILOGENIA

Dentre os 10 isolados positivos, 9 demonstraram semelhança com uma sequência, depositada em banco de dados moleculares (Genbank), obtida de solo da cidade de Colombo (Paraná-Brasil) (FJ385235), sendo que um apresentou semelhança com outra sequência, também depositada no Genbank, obtida de uma infecção disseminada ocorrida no EUA (EU103985) (TABELA 3).

TABELA 3: IDENTIFICAÇÃO DE *Cladophialophora* sp e *Exophiala* sp DE DIFERENTES SUBSTRATOS DOS PONTOS AMOSTRAIS

Substrato	Fungos negros	Marcador		Microcultivo	Sequenciamento/Semelhança (n° GenBank)
		<i>Cladophialophora</i> sp	<i>Exophiala</i> sp		
Folha árvore	A, S, C1, C2	A (1), C2(1)	-	Compatível	A = 99% <i>C. devriesii</i> (FJ385235) C2 = 99% <i>C. devriesii</i> (EU103985)
Folha chão	A, S, C1, C2	-	-	-	-
Galho	A, C1, C2	A (2), C2 (4)	-	Compatível	A(2), C2 = 99% <i>C. devriesii</i> (FJ385235) C2 (3) = 94% <i>C. devriesii</i> (FJ385235)
Solo	A, C1, C2	-	-	-	-
Raiz aérea	A, S, C1, C2	C2 (2)	-	Compatível	C2 = 94% <i>C. devriesii</i> (FJ385235) C2 = 99% <i>C. devriesii</i> (FJ385235)
Toca	A, S, C2	-	-	-	-

A = Acupi-fazenda; S = Saubara-controle; C1 = Canavieiras-fazenda; C2 = Canavieiras-controle; (n)= número de isolados. FONTE: O autor (2010)

Na árvore filogenética Bayesiana (FIGURA 8) construída a partir do alinhamento das sequências dos isolados positivos com sequências próximas depositadas em banco de dados moleculares (Genbank) houve a formação de 3 grupos: **grupo I**, contendo isolados de galho (Canavieiras-controle), os quais estão agrupados com *Cladophialophora* sp e *Fonsecaea pedrosoi*; **grupo II**, composto por um isolado de folha da árvore (Canavieiras-controle) que agrupou-se com amostra clínica de *C. devriesii* obtida de doença disseminada; e **grupo III**, no qual se encontra a maioria dos isolados desse estudo, o controle positivo e a amostra previamente isolada de caranguejo com DCL, todos agrupados com *C. devriesii* isolado do meio ambiente (Brasil).

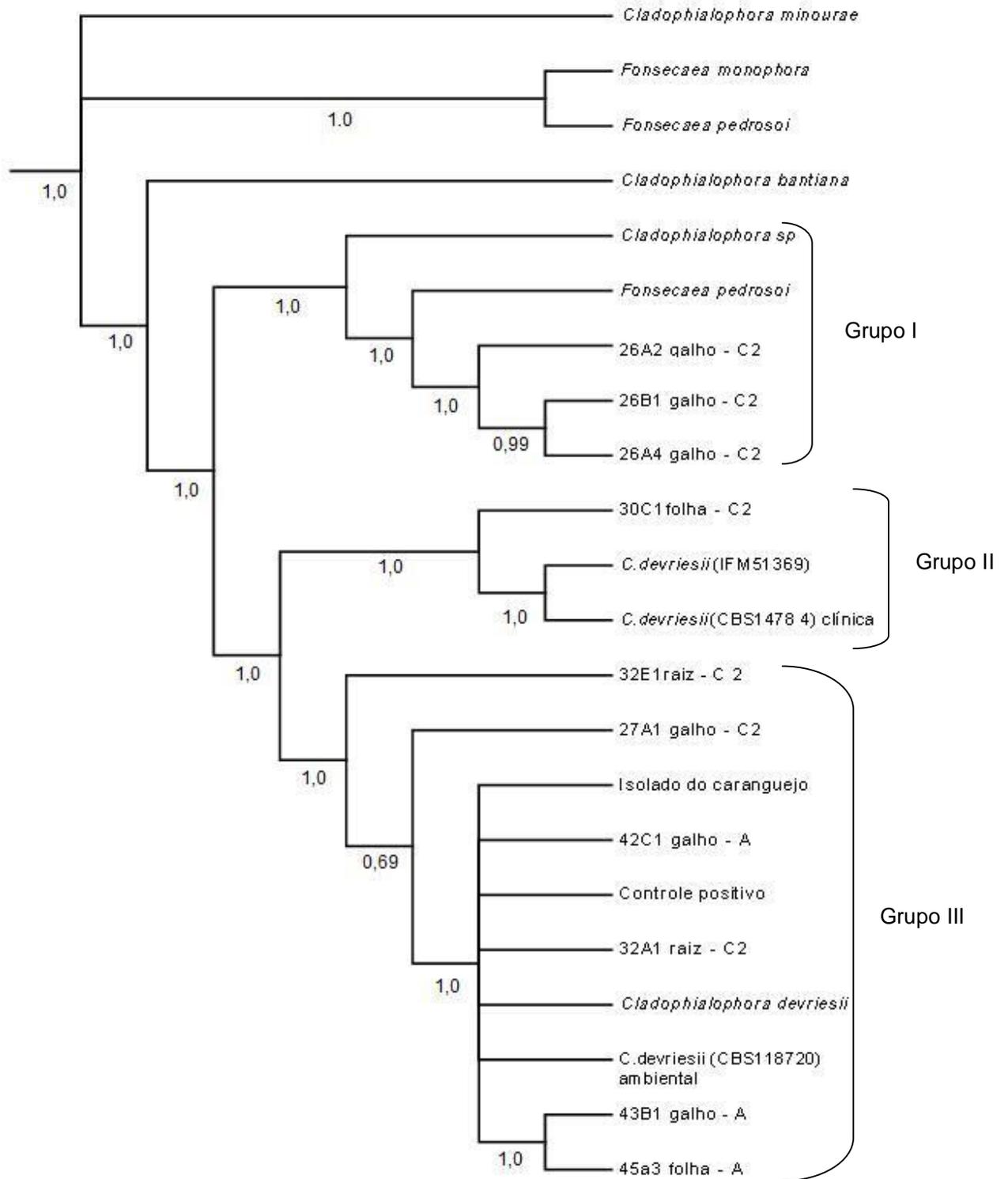


FIGURA 8 - Árvore filogenética das linhagens de *Cladophialophora* sp isoladas nesse estudo e de linhagens próximas depositadas no GENBANK. Valores de probabilidade posterior são apresentadas ao lado de cada ramo.

A- Acupi; C2- Canavieiras- controle

FONTE: O autor (2010)

5.4 MICROMORFOLOGIA DOS ISOLADOS POSITIVOS

As estruturas microscópicas encontradas são compatíveis com a descrição do gênero *Cladophialophora* (FIGURA 9). Conidióforos ausentes ou imperceptíveis. Conídio de uma célula, seco, decorrentes em aparecimento, pouco ramificado, frequentemente com cadeias coerentes, com ou sem ramoconídio; cicatrizes conidiais quase despigmentadas (DE HOOG; GENE; FIGUERAS, 2004).

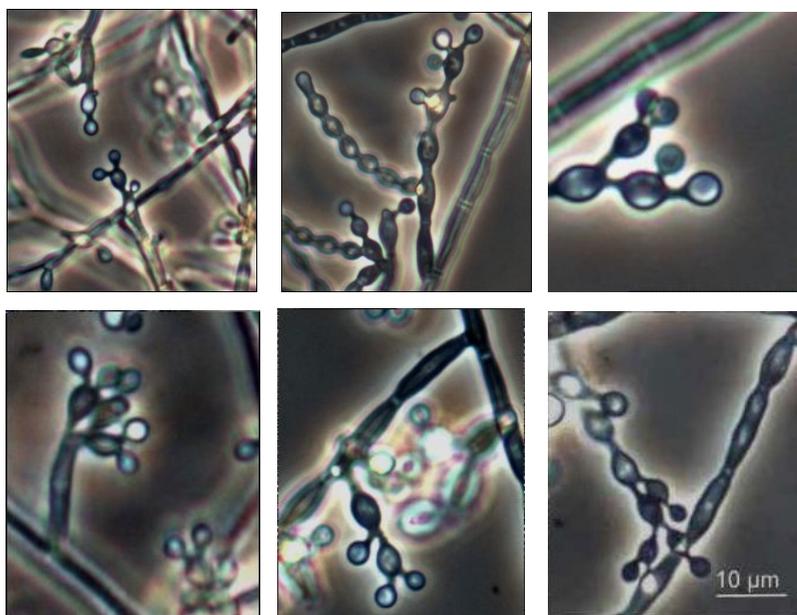


FIGURA 9 - Micromorfologia dos isolados positivos para o marcador de *Cladophialophora* sp (microscopia em contraste de fase). FONTE: O autor (2010)

6 DISCUSSÃO

As amostras positivas para fungos negros foram oriundas, na sua grande maioria, de amostras de material vegetal. De acordo com Dixon, Shadomy e Shadomy (1980), substratos vegetais e solo são adequados para isolamento de fungos negros patógenos na natureza, o qual isolou espécies de material vegetal e solo na Virgínia (USA). Vicente (2000) obteve gêneros, tais como *Rhachlorigium*

spp, *Cladophialophora* spp e *Exophiala* spp, de fontes ambientais tais como solo, cobertura vegetal e madeira, sendo que a madeira em decomposição apresentou os maiores índices de isolamento, seguida de cobertura vegetal em decomposição.

Iwatsu, Miyaji e Okmoto (1981) relatam que a madeira é o habitat natural dos fungos negros e que obtiveram sucesso ao recuperar estes fungos de madeira em decomposição, casca e tronco de *Pinus* spp no Japão. Entretanto, constataram que solo parece não ser um bom habitat. Em contrapartida, Vicente (2000) e Marques *et al* (2006) obtiveram resultados diferentes para este substrato, em Colombo (PR) e Pinheiro (MA), respectivamente. Igualmente, Satow *et al* (2008) ao recuperar grande número de isolados de amostras de solo contaminado com hidrocarbonetos concluindo que estes, presentes no solo da Refinaria de Óleo Paulínia (REPLAN), São Paulo (SP), podem favorecer o crescimento de leveduras negras, funcionando como um fator enriquecedor ou inibindo o crescimento de espécies competitivas. Já Bridge e Newsham (2009) registraram a presença de *Cladophialophora* sp e *Rhinochrysiella* sp no solo da região sul da Antártica demonstrando a grande adaptação desses agentes à temperaturas baixas. Porsani (2007) isolou um fungo negro identificado como *Exophiala* sp do sedimento superficial (2 a 3 cm de profundidade) das regiões entre-marés distribuídas em torno de toda extensão da Ilha do Mel, Litoral Paranaense. Adicionalmente, foram observados relatos de isolamento de fungos negros em água doce e em sedimento úmido vegetado em três regiões distintas ao longo da Gamboa do Perequê-Baía de Paranaguá (PR) (GHIZELINI, 2002).

Em estudo anterior, Boeger e Vicente (2006), aplicando o marcador molecular para o fungo patogênico da DCL em manguezais do Estado de Sergipe, apresentou resultados semelhantes ao presente estudo. O agente patogênico da DCL não foi detectado em amostras ambientais, tais como solo, folhas e espécies de animais cultivadas (camarão de viveiro) ou nativas (ostra, camarão, aratu). Amostras de camarões de viveiro, solo e folhas obtidas de fazendas de carcinocultura localizadas em regiões nas quais a DCL promoveu mortandades extensas, também foram negativas para o marcador. Boeger e Vicente (2006) detectaram o agente patogênico putativo da DCL apenas em *U. cordatus* e um único espécimen de *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825).

Muitas espécies de fungos negros são apenas sapróbias e não causam doenças. Algumas são oportunistas, possuem baixa virulência e podem ser isoladas diretamente do meio ambiente. Em contrapartida, outras são patógenos altamente específicos que não são recuperadas diretamente do meio ambiente, pois aparentemente dependem de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida (VICENTE *et al*, 2008). Dentro deste contexto, o fato de *Exophiala* sp, envolvida na DCL, não ter sido encontrada no meio ambiente sustenta a idéia que esta é, de fato, a espécie patogênica no caso da doença. Ela não foi encontrada na natureza exceto na presença de seu hospedeiro ou de uma espécie de hospedeiro adequado (BOEGER; VICENTE, 2006). De Hoog (1993) sugeriu que os membros da família Herpotrichiellaceae escolhem substratos específicos, devido à sua baixa habilidade competitiva e ao potencial patogênico da espécie.

Na árvore filogenética apresentada na Figura 8 o **grupo I** é composto por 3 isolados obtidos de galho (Canavieiras-controle), os quais estão agrupados com *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora* sp. Entretanto, linhagens de *Fonsecaea* isoladas de ambientes são mais estreitamente relacionadas com espécies de *Cladophialophora* do que as de *Fonsecaea* (DE HOOG *et al*, 2004; NAJAFZADEH *et al*, 2009), corroborando, portanto, com o agrupamento obtido neste trabalho. Contudo, *Cladophialophora* sp encontrada neste grupo, embora esteja publicado no Genbank sem determinação da espécie, em De Hoog *et al* (2000) foi identificado como *C. devriesii*, reforçando a relação desses isolados com esta espécie. Entretanto, no **grupo II**, isolado de folha da árvore (Canavieiras-controle) agrupa-se com amostra clínica de *C. devriesii* obtida de doença disseminada. Estudos sobre leveduras negras demonstraram relação filogenética entre espécies clínicas e sapróbias (VICENTE, 2000; DE HOOG *et al*, 2000; DE HOOG *et al*, 2007; BADALI, 2008). No entanto, no **grupo III** encontram-se a maioria dos isolados (raiz e galho de Canavieiras-controle; galho e folha de Acupi-fazenda), o controle positivo e a amostra isolada de caranguejo, agrupados com linhagem de *C. devriesii* obtida do meio ambiente (Brasil).

De fato, espécies de *Cladophialophora* são encontradas como fitopatógenos, endófitos e sapróbios ambientais, ocorrendo em material vegetal, tronco de árvore, madeira e material vegetal em decomposição, solo e solos poluídos com hidrocarbonetos de petróleo (CROUS *et al*, 2007; DAVEY; CURRAH, 2007; BADALI

et al., 2008; MARQUES *et al.*, 2006; VICENTE, 2000; YONEZAWA *et al.*, 2004; NARISAWA *et al.*, 2007; PRENAFETA-BOLDÚ *et al.*, 2001).

Este dado vem a corroborar com estudos anteriores nos quais *Cladophialophora* sp foi encontrada em folhas em decomposição em regiões submetidas a mortandades prévias (VICENTE; BOEGER, 2006) e detectada apenas em uma porção dos eventos de mortandades de caranguejos documentadas e associadas à DCL (Boeger, comunicação pessoal). Esta espécie de *Cladophialophora* detectada simultaneamente à espécie de *Exophiala* em caranguejos com sinais clínicos da DCL, todavia, parece representar de fato uma espécie oportunista. Esse resultado reforça a conclusão de que essa espécie é oportunista no caso da DCL, tornando-se invasiva quando o hospedeiro, no caso o caranguejo, torna-se enfraquecido por *Exophiala* sp (VICENTE, 2000; BOEGER; VICENTE, 2006). Além disso, enfermidades previamente associadas com espécies de fungos negros Herpotrichiellaceos indicam seu caráter oportunista, atuando como agente patogênico apenas quando o sistema de defesa do hospedeiro encontra-se enfraquecido (BADALI *et al*, 2008; BADALI *et al*, 2009; FERNANDES *et al*, 2007; DE HOOG *et al*, 2007).

O fato de fungos negros causarem infecções oportunistas indica que essas espécies possuem fatores de crescimento nos seus nichos naturais, os quais devem favorecer a sobrevivência dentro de hospedeiros vertebrados e invertebrados (DE HOOG, 1997). Assim, a determinação das fontes de fungos patógenos na natureza representa uma informação fundamental para a elucidação de aspectos epidemiológicos, sendo que o conhecimento de uma determinada área geográfica endêmica pode facilitar no entendimento da rota de infecção e dispersão do agente (McGINNIS, 1992).

7 CONCLUSÕES

- *Exophiala* sp é, provavelmente, um organismo verdadeiramente patogênico, uma vez que, mesmo em regiões nas quais ocorreram mortandades, a espécie não pôde ser detectada em amostras ambientais, suportando sua associação como causador da DCL;
- *Cladophialophora* sp, provavelmente, representa uma agente oportunista na DCL, pois é amplamente encontrado em amostras ambientais;
- Não existem evidências suportando a hipótese de que fazendas de carcinocultura sejam responsáveis pela introdução ou facilitação do crescimento do agente patogênico nos manguezais afetados pela DCL.

REFERÊNCIAS

- AJELLO, L. The black yeasts as disease agents: historical perspective. **Pan American Health Organization Scientific Publication**, n.356, p.9-16, 1978
- AL-DORY, Y. Chromomycosis in Di Salvo, A.F. **Occupational mycoses**. Philadelphia: Lea & Febiger. 1983. p. 95-121
- ALVES, R.R.N.; NISHIDA, A.K. Aspectos socioeconômicos e percepção ambiental dos catadores de caranguejo-uçá *Ucides cordatus cordatus* (L. 1763) (Decapoda, Brachyura) do estuário do rio Mamanguape, nordeste do Brasil. **Interciência**. v.28, n.1, p. 36-43, 2003
- BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M.J.; BONIFAZ, A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.D; DE HOOG de, G.S.; Biodiversity of the genus *Cladophialophora* **Studies in Mycology**. v.61, p.175-191, 2008
- BADALI, H.; CARVALHO V.O; VICENTE, V; ATTILI-ANGELIS, D; KWIATKOWSKI I.B; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H; DE HOOG, G.S. *Cladophialophora saturnica* sp. nov., a new opportunistic species of Chaetothyriales revealed using molecular data. **Medical Mycology**. v.47, 1ed, February, p.51-62, 2009
- BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL (BLAST). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Acesso em: Agosto de 2007.
- BOEGER, W.; PIE, M.; OSTRENSKY, A.; PATELLA, L. Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.100, n.2, p.61-167, 2005
- BOEGER, W; PIE, M. A Doença do Caranguejo Letárgico: o agente causador e sua forma de ação. **Revista do GIA**. n.2, p.18-19, 2006
- BOEGER, W.; VICENTE, V.A. Doença do Caranguejo Letárgico: o agente causador e sua forma de ação. **Revista do GIA**. n 2, p 18-19, 2006
- BOEGER, W., PIE, M., VICENTE, V., OSTRENSKY, A., HUNGRIA, D., CASTILHO, M G. Histopathology of the mangrove land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae), affected by Lethargic Crab Disease: clues to understand the disease. Disease: clues to understanding the disease. **Diseases of Aquatic Organisms**. v.78, p.73–81, 2007
- BRIDGE, P.D; NEWSHAM, K.K. Soil fungal community composition at Mars Oasis a southern maritime Antarctic site, assessed by PCR amplification and cloning. **Fungal Ecology** v. 2, p.66-74, 2009
- CALIGIORNE, R.B.; RESENDEL, M.A. de.; DIAS-NETO, E.; OLIVEIRA, S.C.; AZEVEDO,V. Dematiaceous fungal pathogens: analysis of ribosomal

DNA gene polymorphism by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism. **Mycoses**, v.42, p.609-614, 1999

CARMICHAEL J.W Cerebral mycetoma of trout due to a Phialophora-like fungus. **Sabouraudia**, v.6,p.120–123, 1967

CASTILHO, G. A Doença do Caranguejo Letárgico: o agente causador e sua forma de ação. **Revista do GIA**. n 2, p.18-19, 2006

CROUS,P. W; SCHUBERT, K; BRAUN, U; G.S. DE HOOG DE G.S; HOCKING, A.D; SHIN, H.D GROENEWALD, J.Z Opportunistic, human-pathogenic species in the *Herpotrichiellaceae* are phenotypically similar to saprobic or phytopathogenic species in the *Venturiaceae* **Studies in Mycology**. n.58, p.185–217, 2007.

DAVEY, ML.; CURRAH, R.S A new species of *Cladophialophora* (hyphomycetes) from boreal and montane bryophytes. **Mycological Research**, v.111, Issue 1, p. 106-116, 2007

DE HOOG, G.S. de. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host **Antonie van Leeuwenhoek**, v.63, p.105-109, 1993

DE HOOG, G.S.; HAASE, G. Nutritional physiology and selective isolation of *Exophiala dermatitidis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.64, n.17, p.17-26, 1993

DE HOOG, G.S.; BOWMAN, B.; GRASER, Y.; HAASE, G.; EL FARI, M.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; MELZER-KRICK, B.; UNTEREINER, W.A. Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi. **Medical Mycology**. Supplement. v.36, 1ed, p.52-56, 1998

DE HOOG, G.S.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. **Mycoses**, v.41, p.183–189, 1998

DE HOOG, G.S.; TELLES-QUEIROZ, F; HAASE, G.; FERNANDEZ-ZEPPENFELDT, G.; ANGELISS, D.A; GERRIS VAN DEN ENDE, A.H.G; MATOS, T; PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H; PIZZIRANI-KELINER, A.A; RAINER, J; YEGRESS, N.R; VIECENTE, V.; YEGRESS, F. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. **Medical Mycology**. Supplement 1, n 38, p. 243-250, 2000

DE HOOG, G.S.; GENE, H.; FIGUERAS, M.J. **Atlas of clinical fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2004. 1 CD-ROOM

DE HOOG. G.S.; ATTILII-ANGELIS, D.; VICENTE, V.A.; VAN DEN ENDE, A.H.; QUEIROZ-TELLES.F. Molecular ecology and pathogenic os *Fonsecaea* species. **Medical Mycology**, v.42, n. 5, p.405-416, 2004

DE HOOG, G.S.; ZENG, E.J.S.; HARRAK, E.M.J.; SUTTON,E.D.A *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons **Antonie van Leeuwenhoek**, v.90, n.3, p.257-268, 2006

DE HOOG, G.S.; NISHIKAKU, A.S.; FERNANDEZ-ZEPPEFELDT, G.; PADÍN-GONGÁLEZ, C.; BURGER, E.; BADALI, H.; PICHARD-YEGRES, N.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with description of a novel species. **Studies in Mycology**, v.58, p. 219-234, 2007

DIXON, D. M.; POLAK- WYSS, A. The medically important dematiaceous fungi and their identification. **Mycoses**, v.34, n.3, p.1-18, 1991

DIXON, D. M.; SHADOMY, H.J; SHADOMY, S. Dematiaceous fungal pathogens isolated from nature. **Mycopathologia**, v.70, n.3, p.153-161, 1980

DOVER, C.L.V; MEGAN, E.W; SCOTT, J.L; UNDERDOWN, J; ANDERSON, B.; GUSTAFSON, C.; WHALEN, M.; CARNEGIE, R.B. A fungal epizootic in mussels at a deep-sea hydrothermal vent. **Marine Ecology**, n.28, p.54-58, 2007

FERNANDES, N.C.; NACIF, D.; AKITI, T.; CUZZI, T. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladophialophora* sp: a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** v. 49, n. 2, p.109-112, 2007

FERREIRA, C.P.; MANCERA, P.F.A.; PIE, M.R.; BOEGER, W.A.; ESTEVA, L. Modelling the letargic crab disease. **Journal of Biological Dynamics**, v. 03, 6ed, 2009

GASKINS J.E, CHEUNG P.J *Exophiala pisciphila*: a study of its development. **Mycopathologia**, v.93, p.173–184, 1986

GHIZELINI, A.M. **Análise quantitativa e qualitativa de fungos do Parque Natural Municipal do Manguezal da Gamboa do Perequê, Paraná, Brasil**. Curitiba, 2002. 36p. Monografia, Universidade Federal do Paraná

GIA. Mortandade do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus*. **Desenvolvimento do marcador molecular**. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 2005. 14p. Relatório Técnico

GUARRO,J.; GENE, J.; STCHIGEL.A.M. Developments in Fungal Taxonomy **CLINICAL Microbiology Reviews**, v. 2, n. 3, p. 454–500,1999

GUNDE-CIMERMAN, N.; PLEMENITAS, A. Ecology and molecular adaptations of the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**. v. 5, p. 323–331, 2006

HALL, T.A. **BioEdit**: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* (1999) 41: 95 – 98.

HAYNES,K.A.; WESTERNENG, T.J.; FELL, J.W.; MOENS, W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. **Medical Mycology**. v.33, n.5, p.319-325, 1995

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**. v.66, n.4, p.411-453, 1991

IWATSU, T.; MIYAJI, M; OKMOTO, S. Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan. **Mycopathologia**, v.75, p.149-158. 1981

KERN, M. E., BLEVINS, K. S. **Micologia médica – Texto e Atlas**. 2. ed. São Paulo: Editorial Premier, 1999.

KURATA, O.; MUNCHAM, C.; WADA, S.; HATAI, K.; MIYOSHI, Y.; FUKUDA, Y. Novel *Exophiala* infection involving ulcerative skin lesions in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fisch Pathology**, v.43, n.1, p.35-44, 2008

LOPES, P.R.D.; OLIVEIRA-SILVA, J.T.de.; FERREIRA-MELO, A.S.A.de.; Contribuição ao conhecimento da ictiofauna do manguezal de Cacha Pregos, Ilha de Taparica, Baía de Todos os Santos, Bahia. **Revista Brasileira de Zoologia**, n.15, v. 2, p. 315-325, 1998

MARQUES, S. G.; SILVA, C. M. T. ; SALDANHA, P. C. ; REZENDE, M. A. ; VICENTE, V. A. ; TELLES, F ; COSTA, J. L. M. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão Brazil. **Journal of Medical Mycology**, v.47, p.305-311, 2006.

MATOS, T.; HASE, G.; GERRITS VAN DEN ENDE.; DE HOOG, G.S. Molecular diversity of oligotrophic and neurotrophic members of the black yeast genus *Exophiala*, with accent on *E. dermatitidis* **Antonie van Leeuwenhoek**. n.83, p. 293–303, 2003

McGINNIS, M.R. Chromoblastomycosis and Phaeohyphomycosis: New concepts, diagnosis and mycology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.8, p.1-16, 1983

McGINNIS, M.R. Black fungi. A model for understanding tropical mycosis. In: WALKER DH, ed. **Global infectious diseases**. New York: Springer-Verlog, 1992. p.129-149, 1992

MCGINNIS, M. R; AJELLO, L. A new species of *Exophiala* isolated from channel catfish. **Mycologia**, v.66, n. 5, p.18-520, 1974.

MONTERO-GEI, F. Ecology and epidemiology of chromomycosis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MYCOSES. Washington, 1970. **Proceedings**. Washington: Pan American Health Organization Scientific Publication, 1970. p.182-184

MOK, W.Y.; CASTELO, F.P.; SILVA da B. M.S Occurrence of *Exophiala werneckii* on salted freshwater fish *Osteoglossum bicirrhosum* **International Journal of Food Science & Technology**. v.16, Issue 5, p.505-512, 2007

NAJAFZADEH, M.J.; GUEIDAN, C.; BADALI, H.; VAN DEN ENDE, A.H.; XI, L.; DE HOOG GS. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. **Medical Mycology**, v.47, n.1, p.17-25, 2009

NARISAWA, K; HAMBLETON, S; CURRAH, R.S. *Heteroconium chaetospira*, a dark septate root endophyte allied to the Herpotrichiellaceae (Chaetothyriales) obtained from some forest soil samples in Canada using bait plants. **Mycoscience** v.48, n.45, p. 274-281, 2007

NORDHAUS, I.; WOLF, M. Feeding ecology of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae): food choice, food quality and assimilation efficiency. **Marine Biology**, v.151, n. 05, p. 1665-1681, 2007

NIEVES-RIVERA, A.M. **Coastal mycology of Puerto Rico: A survey and biological aspects of marine, estuarine, and mangrove fungi**. Dissertation. University of Puerto Rico, Mayagüez. Puerto-Rico, 382 p., 2005

NUDI, A. H; WAGENER, A.L.R.de.; FRANCONI, E.; SCOFIELD, A.L de.; SETTE, C.; VEIGA, A. Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluation sediment and crab PAH records. **Environment International**, v. 33, p. 315-327, 2007

NYAOKE, A.; WEBER, E.S.; INNIS, C.; STREMMER, D.; DOWD, C.; HINCKLEY, L.; GORTON, T.; WICKES, B.; SUTTON, D.; DE HOOG. S.; FRASCA Jr, S. Disseminated phaeohyphomycosis in weedy seadragons (*Phyllopteryx taeniolatus*) and leafy seadragons (*Phycodurus eques*) caused by species of *Exophiala*, including a novel species. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 69-79, 2009

OTIS, E.J; WOLKE, R.E Infection of *Exophiala salmonis* in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) **Journal of Wildlife Diseases**.v. 21, n.1, p. 61-64, 1985

PORSANI, M.V. **Variabilidade espacial de fungos da região entre-marés da Ilha do Mel – Paraná**. Curitiba, 2007, 38p. Monografia Universidade Federal do Paraná

PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; KUHN, A., LUYKX, M.A.M.; ANKE, H.; GROENESTIJN, J.W.V.; BONT, J.A.M Isolation and characteriaation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. **Mycological Research**, v. 105, p. 477-484, 2001

PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; SUMMERBELL, R.; DE HOOG, SYBREN, G. Fungigrowing onaromatic hydrocarbons: biotechnology’s unexpected encounterwith biohazard? **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**. n.30, p. 109-130, 2006

REUTER RE, HUTCHINSON W, HAM J, DAVIS S *Exophiala* sp. infection in captured King George whiting, *Sillaginodes punctata*. **Bulletin of The European Association of Fish Pathologists**, v. 23, p.128–134, 2003

RIBEIRO, R.O. **Doença do caranguejo letárgico: desvendando questões etiológicas, epidemiológicas e de saúde pública.** Curitiba, 2008, 82p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná

RICHARDS, R. H., HOLLIMAN, A; HELGASON, S *Exophiala salmonis* infection in Atlantic salmon. **Journal of Fish Diseases**, v.1, p. 357-368, 1978

RIPPON, J.W. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. In: **Medical Mycology** Philadelphia: WB Saunders, p.276-296, 1988

SATOW, M. M; ATTILI-ANGELIS, D.; DE HOOG, S. G.; VICENTE, V. A. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 157-163, 2008

SCHMIDT, A. J. **Estudo da dinâmica populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus cordatus* e dos efeitos de uma mortalidade em massa desta espécie em manguezais do Sul da Bahia.** Dissertação de Mestrado em Oceanografia Biológica, IOUSP, São Paulo, 199p., 2006

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; COELHO,C.Jr.; ALMEIDA, R.; MENGHINI, R.P A mortandade de caranguejo-do-mangue no Nordeste do Brasil: Evidências circunstanciais para uma epizootia com origem relacionada à produção de camarão peneídeo marinho. II Simpósio Brasileiro de Oceanografia, São Paulo, 2004

SPATAFORA, J.W.; MITCHELL, T.G.; VILGALYS, R. Analysis of genes coding for small-subunit rRNA sequences in studying phylogenetics of dematiaceous fungal pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n.5, p. 1322-1326, 1995

STERFLINGER, K. Black Yeasts and Meristematic Fungi: Ecology, Diversity and Identification. In: ROSA, C. e PÉTER, G. (Org.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts.** Heidelberg: Spring-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. p. 501-514

SUDHADHAM, M.; PRAKITSIN, S.; SIVICHAI, S.; CHAIYARAT, R.; DORRESTEIN, G.M.; MENKEN S.B.J.; DE HOOG, G.S.The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. **Studies in Mycology**, v.61, n. 1, 2008

THOMPSON J.D; HIGGINS D.G; GIBSON T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. 22: 4673-4680, 1994

UNTEREINER, W.A.; NAVEAU, F.A.; Molecular systematics of the herpotrichiellaeae with an assessment of the phylogenetic positions of *Exophiala dermatitidis* and *Phialophora americana* **Mycologia**, v. 91, n. 1, p. 67-83, 1999

VICENTE, V.A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose.** São Paulo, 2000, 181p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz"

VICENTE, V.A.; ANGELIS, D.A.; QUEIROZ-TELLES, F. FLO.; PIZZIRANI, K. A
Isolation of Herpotrichiellacious fungi from the environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 47-51, 2001

VICENTE, V.A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M.R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L.M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI, K. A.
Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137–144, 2008

YONEZAWA, M; USUKI, F; KAZUHIKO NARISAWA, K; TAKAHASHI, J; HASHIBA, T
Anatomical study on the interaction between the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora* and Chinese cabbage **Mycoscience** v. 45, n. 6, p. 367-371, 2004

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications.** (MA Innis, DA Gelfand JJ, Sninsky. TJ White eds) Academic Press, San Diego, U.S.A, 1990

ZENG, J.S.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.W.; RINALDI, M.G.; HARRAK, M.J.; DE HOOG, G.S. Spectrum of clinically relevant *Exophiala* species in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.11, p.3713–3720, 2007

ANEXO

Meios de cultura e soluções utilizadas

1 Meio Mycosel (Himedia)

Dextrose - 10g
Peptona de soja - 10g
Cloranfenicol - 0,05g
Ciclohexamida - 0,4g
Ágar - 15,5g
Água destilada – 1000ml

2 Meio Agar Saboraud Dextrosado

Dextrose - 40g
Peptona - 10g
Agar - 15g
Água destilada - 1000ml

3 Solução salina

Cloreto de sódio – 8,5g
Água destilada – 1000ml

4 Antibióticos

Dissolver a ciclohexamida em acetona, cloranfenicol em álcool e a penicilina e a estreptomicina em água. Após dissolver, esterilizar com filtro “Millipore”.

5 Solução salina com antibióticos

Cloreto de sódio - 8,5
Água destilada - 1000ml
Distribuir 100ml em frascos erlenmeyers de 250ml e esterilizar. Após resfriar acrescentar os antibióticos: 200 unidades de penicilina, 200µg/mL de estreptomicina, 200µg/mL de cloranfenicol e 500µg/mL de ciclohexamida

6 Tampão CTAB

Tris-base - 2,42 g
Cloreto de sódio - 8,2 g
NaEDTA - 2,0 g
Água destilada - 8,0 mL
O pH final foi ajustado para 7,5 com HCL 1N.

7 Tampão TBE (10x)

Tris-base - 108g
EDTA - 9,3g

Ácido Bórico - 55g
Água destilada - 1000mL

8 Solução EDTA 0,5M pH 8,0 + N-Laurilsarcosinato de Sódio (NaEDTA)

EDTA pH8,0 - 50 mM
N-Laurilsarcosinato de Sódio 1% (p/v)
A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

9 Solução EDTA 0,5 M pH 8,0

O ph desta solução foi ajustado para 8,0 com NaOH 10N. Para obtenção de EDTA 50mM, diluiu-se esta solução 10 vezes. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

10 Solução estoque de Tris-HCl 1M pH 9,5

Tris-base 1M
O Ph foi ajustado para 9,5 com HCl p.a.

11 Gel de agarose 1,5%

Agarose - 0,9g
Tampão TBE 60mL