



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

ESTUDO DA DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E  
MOLECULAR DE *Ganoderma spp*  
(GANODERMATACEAE) E DO COMPLEXO  
TAXONÔMICO *Phellinus piptadeniae*  
(HYMENOGASTRACEAE)

**MARIANA FERNANDES**

Orientador: Prof. Tit. Eduardo Bagagli

Monografia apresentada ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu como exigência para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Botucatu – SP  
Janeiro 2014





**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

ESTUDO DA DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E  
MOLECULAR DE *Ganoderma spp*  
(GANODERMATACEAE) E DO COMPLEXO  
TAXONÔMICO *Phellinus piptadeniae*  
(HYMENOCHAETACEAE)

**MARIANA FERNANDES**

Orientador: Prof. Tit. Eduardo Bagagli

Monografia apresentada ao Departamento  
de Microbiologia e Imunologia do Instituto  
de Biociências da UNESP – Campus de  
Botucatu como exigência para a obtenção  
do título de bacharel em Ciências  
Biológicas

Botucatu – SP  
Janeiro 2014

A todos que me ensinaram, a todos que ensinei, dedico este e todos os trabalhos de minha vida.

ESTUDO DA DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E  
MOLECULAR DE *Ganoderma spp*  
(GANODERMATACEAE) E DO COMPLEXO  
TAXONÔMICO *Phellinus piptadeniae*  
(HYMENOCHAETACEAE)

Agradeço imensamente ao professor Eduardo Bagagli, exemplo de pessoa e profissional a ser seguido, pela oportunidade dada a mim em poder realizar esse trabalho sob sua orientação.

Agradeço ao Professor Ricardo Drechsler pelo cuidado, paciência, confiança e também pela oportunidade em poder realizar esse trabalho sob sua co-orientação.

Aos queridos Assis, Thales, Raquel e Gabriel pela amizade sincera, convivência e parceria diária.

À turma XLV de Biologia da UNESP de Botucatu: pela honra, pela garra e pela coragem.

Ao povo do Estado de São Paulo que contribui para a manutenção da qualidade e excelência dessa Universidade que me forma.

“O homem, com suas nobres qualidades, ainda carrega no corpo a marca indelével de sua origem modesta.”

**Charles Robert Darwin**

“Privatizaram sua vida, seu trabalho, sua hora de amar e seu direito de pensar. É da empresa privada o seu passo em frente, seu pão e seu salário. E agora, não contentes, querem privatizar o conhecimento, a sabedoria, o pensamento, que só à humanidade pertencem.”

**Bertolt Brecht**

“Fica proibido o uso da palavra liberdade, a qual será suprimida dos dicionários e do pântano enganoso das bocas.

A partir deste instante a liberdade será algo vivo e transparente como um fogo ou um rio, e a sua morada será sempre o coração do homem”.

**Thiago de Mello**

Santiago do Chile, abril de 1964

---

---

## **CAPÍTULO i:**

INTRODUÇÃO..... 1, 2 e 3.

OBJETIVOS..... 3 e 4.

MATERIAL E MÉTODOS..... 4 a 9.

RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 9 a 27.

CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 27.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 27 a 29.

## Lista de Tabelas:

**Tabela 1:** Dados de campo das coletas, número de tombo, coordenadas geográficas e espécie morfológica identificada.

p. 10

**Tabela 2:** Dados de identificações moleculares de *Ganoderma* spp, com número de coletor, identificação morfológica, porcentagens da identidade e respectivos acessos Genbank.

p. 20

**Tabela 3:** Sequencias depositadas no banco de dados Genbank

p. 21 e 22

## Lista de Figuras:

**Figura 1:** (a) Localização do município de Botucatu no Estado de São Paulo; (b) áreas de coleta em fragmento florestal (c) áreas de coleta na cidade.

p. 4 e 5

**Figura 2:** (a) e (b) Retirada de material dos basidiomas coletados para análises moleculares

p. 6

**Figura 3:** Aspecto macroscópico do basidioma (a) e (c) e da superfície himenial.(b) e (d) de *Ganoderma australe*.

p. 13

**Figura 4:** Basidiósporos de *Ganoderma australe* (Coloração: lactofenol azul- algodão).

\_\_\_\_\_ p. 13

**Figura 5:** Tubos e contexto de contexto do basidioma de *Ganoderma australe*.

\_\_\_\_\_ p. 14

**Figura 6:** (Aspecto macroscópico do basidioma (a),(c),(e) e (g) e da superfície himenial. (b),(d),(f) e (h) de *Ganoderma perzonatum*

\_\_\_\_\_ p. 14 e 15

**Figura 7:** (a),(b),(c),e,(d): Primórdios de basidiomas coletados de *Ganoderma perzonatum*

\_\_\_\_\_ p. 15

**Figura 8:** Basidiósporos de *Ganoderma perzonatum* (Coloração: lactofenol azul- algodão).

\_\_\_\_\_ p. 16

**Figura 9:** (a) e (b) Estruturas resinosas no contexto do basidioma de *Ganoderma perzonatum*.

\_\_\_\_\_ p.16

**Figura 10:** (a) Placas com início de desenvolvimento micelial de parte das amostras usadas nas tentativas de isolamento; (b) e (c) Placas com contaminantes.

p. 17

**Figura 11:** Placa de micro cultivo de material oriundo das placas de tentativas de isolamento. Detalhe para a esporulação de possível contaminante.

p. 17

**Figura 12:** Gel de agarose com parte das amostras amplificadas. Legenda: a) 1 a 9 e b) 1 a 13: bandas dos amplicons do material ambiental. M - marcador molecular de 100pb Low Mass Ladder Invitrogen.

p. 19

**Figura 13:** Árvore filogenética (máxima verossimilhança) com as espécies de Ganoderma da região de Botucatu, obtida pela análise de sequência de ITS rDNA.

p. 23

**Figura 14:** Árvore filogenética (*Neighbor Joining*) com as espécies de Ganoderma da região de Botucatu, obtida pela análise de sequência de ITS rDNA.

p.23

**Figura 15:** Árvore filogenética (Máxima parcimônia) com as espécies de Ganoderma da região de Botucatu, obtida pela análise de sequência de ITS rDNA.

p.24

## **CAPÍTULO ii:**

INTRODUÇÃO..... 31 e 32.

OBJETIVOS..... 33.

MATERIAL E MÉTODOS..... 33 a 40.

RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 40 a 61.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 61 a 62.

## Lista de Tabelas:

**Tabela 1:** Dados de campo das coletas e coordenadas geográficas dos espécimes coletados.

p. 41 e 42.

**Tabela 2:** Dados macro e micro morfológicos dos basidiomas coletados.

p. 44

**Tabela 3:** Dados de identificações moleculares de *Phellinus piptadeniae*, com número de coletor, identificação molecular das regiões estudadas e respectivos acessos Genbank.

p. 51 e 52

## Lista de Figuras:

**Figura 1:** Mapas dos Municípios de Botucatu e Campinas. a) Localização do município de Botucatu no Estado de São Paulo; b) Localização do município de Campinas no Estado de São Paulo;

p. 34

**Figura 2:** Áreas de coleta. a) Vista aérea da Fazenda Lajeado (Google Earth) – Botucatu – detalhe para o mapa a área de coleta (Trilha Ecológica Casa da Natureza). b) Bosque dos Jequitibás – Campinas – Vista aérea do bosque – fonte Google; c) Visita ao Bosque para expedição de Campo.

p. 34 e 35

**Figura 3:** (a) (b) e (c) Basidiomas em campo sob seu hospedeiro, pau jacaré.



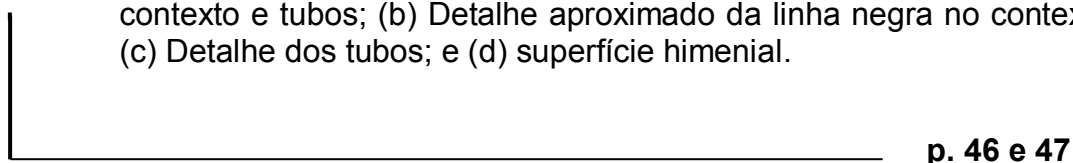
**Figura 4:** Basidiomas em laboratório, após desidratação.



**Figura 5:** Parte interna do basidioma – Tubos, contexto e linha negra.



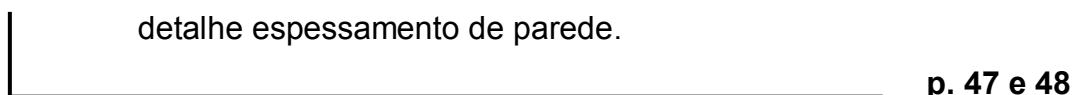
**Figura 6:** (a) Parte interna do basidioma – Detalhe aproximado da porção do contexto e tubos; (b) Detalhe aproximado da linha negra no contexto; (c) Detalhe dos tubos; e (d) superfície himenial.



**Figura 7:** (a),(b),(c),e,(d) Primórdios de basidiomas coletados de *Ganoderma perzonatum*



**Figura 8:** (a), (b) Sistema Hifal – hifas generativas; e (c) hifas generativas detalhe espessamento de parede.



**Figura 9:** (a), (b) Basidiósporos; e (c) Basidiósporos – detalhe da parede.



**Figura 10:** (a) Placas com início de desenvolvimento micelial de parte das amostras dos inóculos usados nas tentativas de isolamento; (b) micélio crescente em fragmento repicado para nova placa; (c) Placas com micélio bem desenvolvido.

p. 49

**Figura 11:** (a) e (b) Gel de agarose 1.5% com parte das amostras amplificadas para região LSU. Bandas com aproximadamente 1000pb.

p. 50

**Figura 12:** Gel de agarose 1.5% com parte das amostras amplificadas para região ITS. Detalhe para bandas que não saíram dos poços durante a corrida. Presença de arrastes.

p. 50

**Figura 13:** Árvore filogenética (máxima verossimilhança) com as espécimes de *Phellinusiptadeniae* da região de Botucatu e Campinas, obtida pela análise de sequência de ITS rDNA.

p. 54

**Figura 14:** Árvore filogenética (máxima verossimilhança) com as espécimes de *Phellinusiptadeniae* da região de Botucatu e Campinas, obtida pela análise de sequência de LSU rDNA.

p. 55

**Figura 15:** Árvore filogenética (máxima verossimilhança) com as espécimes de *Phellinusiptadeniae* da região de Botucatu e Campinas, obtida pela análise de sequência de LSU e ITS rDNA concatenadas.

p. 56

**Figura 16:** Árvore filogenética (*Neighbor Joining*) com as espécimes de *Phellinusiptadeniae* da região de Botucatu e Campinas, obtida pela análise de sequência de ITS rDNA.

**p. 57**

**Figura 17:** Árvore filogenética (*Neighbor Joining*) com as espécimes de *Phellinusiptadeniae* da região de Botucatu e Campinas, obtida pela análise de sequência de LSU rDNA.

**p. 58**

**Figura 18:** Árvore filogenética (*Neighbor Joining*) com as espécimes de *Phellinusiptadeniae* da região de Botucatu e Campinas, obtida pela análise de sequência de LSU e ITS rDNA concatenadas (Bayesiana).

**p. 59**



# ESTUDO DA DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Ganoderma spp* (GANODERMATACEAE) E DO COMPLEXO TAXONÔMICO *Phellinus piptadeniae* (HYMENOCHAETACEAE)

## RESUMO

A taxonomia dos Fungos poliporóides ainda apresenta enormes desafios uma vez que a diferenciação taxonômica tradicional leva em consideração características variáveis, favorecendo a ocorrência de sobreposição entre táxons, e também se tem criado muitos sinônimos, o que resulta em larga ambiguidade de delimitação das espécies e ao mesmo tempo de difícil identificação. Como alternativa a esses problemas a ferramenta molecular pode servir como instrumento fundamental para contribuir na elucidação dos táxons e da filogenia do grupo.

Nesse viés, o gênero *Ganoderma* Karst. (Ganodermataceae Donk) e o complexo *Phellinus piptadeniae* Teixeira (Hymenochaetaceae Donk) são macro fungos cuja elucidação taxonômica se faz necessária não apenas pela importância ecológica, mas também pela importância evolutiva e biogeográfica desses táxons.

O objetivo desse projeto é aumentar o conhecimento da diversidade desses organismos associados a árvores da região de Botucatu. O desenvolvimento do trabalho possibilitará o treinamento na identificação clássica e molecular destas espécies, a investigação sobre ecologia e o(s) tipo(s) de relação que esses organismos possuem com as plantas hospedeiras.

**CAPÍTULO i** - ESTUDO DA DIVERSIDADE  
MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Ganoderma*  
*spp* (GANODERMATACEAE)

## INTRODUÇÃO

Os fungos macroscópicos pertencentes à divisão Basidiomycota são bem diversos e são comumente conhecidos como cogumelos, fungos gelatinosos, orelhas de pau, dentre outros. São caracterizados principalmente pelo fato de produzirem esporos sexuais (basidiósporos) em terminações hifais especializadas, os basídios, que por sua vez, são produzidos em estruturas macroscópicas esporulantes de ampla variação morfológica, os basidiomas. Os basidiósporos constituem o produto final da reprodução sexuada destes organismos e são formados após os eventos de somatogamia, cariogamia e meiose (Alexopoulos *et al.*, 1996). Estes fungos, tradicionalmente reconhecidos como basidiomicetos, mas que atualmente pertencem a *Agaricomycetes* Dowell (Hibbett, 2007), apresentam grande importância ecológica, agrônômica e biotecnológica, uma vez que já está bem estabelecido o papel destes organismos como decompositores, simbiontes de plantas na forma de micorrizas, associação com certos grupos de insetos, e por causarem doenças em plantas de interesse econômico e em alguns casos também em animais, incluindo o próprio homem (Alexopoulos *et al.*, 1996). Mais recentemente, vem sendo também constatada a importância destes organismos como alimentos e fonte de fármacos medicinais (Zhou *et al.*, 2007;).

A família *Ganodermataceae* Donk foi descrita em 1948, baseada na dupla parede dos basidiósporos, em que o exospório é fino e hialino, enquanto o endospório é geralmente espesso, pigmentado, e ornamentado (Cannon & Kirk, 2007). Essa família inclui quatro gêneros: *Amauroderma* Murrill, *Ganoderma* P. Karst, *Haddowia* Steyaert e *Humphreya* Steyaer (Kirk, 2008), com espécies de importância econômica e ecológica, em função de suas propriedades medicinais e de seus papéis na ciclagem de nutrientes no ecossistema. Todas as espécies causam podridão branca, algumas são saprófitas, enquanto outras são parasitas de raízes de árvores (Buchanan, 2001; Ryvarden, 2004).

O gênero *Ganoderma*, estabelecido por Karsten (1881), possui espécies envolvidas no processo de apodrecimento da madeira, que podem ter o píleo lacado ou não (Gottlieb *et al.*, 2000). Esse é o gênero tipo da família, sendo o maior em número de espécies, abrangendo mais de 300 (Bhosle *et al.*, 2010). As espécies desse gênero vivem tanto em ambientes tropicais como temperados. Podem infectar raízes e partes baixas dos troncos; também podem estar em troncos caídos, algumas são saprófitas, enquanto outras são patógenas de árvores vivas. Estão presentes em coníferas, dicotiledôneas, e com menor frequência, em monocotiledôneas (Tovar *et al.*, 2007).

A taxonomia do gênero *Ganoderma* Karsten, ainda apresenta enormes desafios. Algumas espécies dentro do gênero são variáveis morfologicamente, entretanto outras não possuem sequer ínfimas distinções morfológicas (Ryvarden, 2004; Moncalvo, 2005).

A diferenciação taxonômica tradicional é dada pelas características dos basidiomas, incluindo tamanho dos basidiósporos e morfologia da hifa entre outros caracteres macro e microscópicos (Utomo, 2005). No entanto tais características são variáveis ora em função de diferentes condições de crescimento ora em função do diagnóstico dos caracteres e como consequência ocorre a sobreposição entre táxons e criam-se muitos sinônimos, o que resulta em larga ambiguidade de delimitação das espécies e de sistemas identificação, implicando que esses últimos se tornem praticamente impossíveis (Moncalvo, 2005); é muito provável que existam espécies crípticas associadas a esse táxon, de tal forma que vem sendo considerada a existência de complexos de espécies dentro do gênero como o complexo *G. applanatum-australe* e *G. lucidum* (Kaliyapeurumal & Kalaichelvan, 2008; Postnova & Skolotneva, 2010).

Como alternativa à taxonomia clássica e, no intuito de resolver problemas taxonômicos, surge a análise de DNA ribossomal (Moncalvo, 2005), ou seja, a ferramenta molecular torna-se um instrumento complementar fundamental para contribuir na elucidação desses impasses na delimitação de táxons e conseqüentemente para a filogenia do grupo.

Para o Estado de São Paulo, há trabalhos que indicam a ocorrência do gênero em áreas litorâneas e/ou no perímetro do município de São Paulo

capital e grande São Paulo (Gugliotta, 2011; Gugliotta *et al.*, 2010; Bononi *et al.*, 1981). Para o interior, os estudos são mais escassos; segundo Abrahão (2009), na região do Noroeste paulista, limítrofe com o Centro-oeste, Ganodermataceae apresentou dois gêneros e quatro espécies, com apenas uma pertencente à *Ganoderma*: *Amauroderma exile* (Berk.) Torrend, *A. pseudoboletus* (Speg.) J. S. Furtado, *A. sprucei* (Pat.) Torrend e *Ganoderma australe* (Fr.) Pat..

Estudos realizados pelo nosso grupo entre 2011 e 2012 evidenciaram a ocorrência do gênero na região de Botucatu, área de cerrado, com manchas de floresta semi-estacional, o que até então não havia sido registrado, uma vez que não foram encontrados trabalhos sobre a ocorrência desse gênero na região do Centro-oeste paulista; mais especificamente, foi notada a presença da espécie *Ganoderma lucidum* cuja ocorrência no Brasil ainda não foi ratificada, visto que, como sugere Gugliotta, 2011, o registro que havia para sua ocorrência (Jesus, 1993) não foi confirmada, embora segundo Loguercio-Leite, 2005, sua presença foi observada no Estado de Santa Catarina.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Contribuir para a formação de recursos humanos na área da taxonomia clássica e molecular de macro fungos, aumentar o conhecimento da biodiversidade das espécies de *Ganoderma* da região de Botucatu, e contribuir na compreensão das relações filogenéticas do grupo e das espécies aqui encontradas.

### **Objetivos específicos**

- a) Realizar expedições a campo para observação e coleta dos basidiomas;
- b) Identificar a partir da macro e micro morfologia dos espécimes coletados, bem como incorporá-los à coleção de Herbário;
- c) Extrair, amplificar, clonar em vetor plasmidial e sequenciar a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA.

d) Realizar análises filogenéticas dos *amplicons* a serem obtidos juntamente com sequencias já depositadas nos bancos de dados.

## MATERIAL E MÉTODO

### ÁREAS DE ESTUDO E COLETAS

As expedições a campo foram realizadas em fragmentos florestais e áreas urbanas localizados na cidade de Botucatu (Figura 1), na região do centro oeste paulista, cujo clima é classificado como Cwa segundo Koeppen, tropical de altitude, com chuvas no verão e seca no inverno. As temperaturas médias anuais ficam em torno de 20,7°C, e a média anual de precipitação são de 1358,6 mm. O relevo é assimétrico de formação arenito-basáltica, havendo alternância entre vertentes escarpadas e vertentes suaves.



(a)



(b)

●: Área de coleta em fragmento florestal

📌: Área de Coleta na cidade



(c)

Figura 1: (a) Localização do município de Botucatu no Estado de São Paulo; (b) áreas de coleta em fragmento florestal (c) áreas de coleta na cidade.

No município, existe um pequeno fragmento do Bioma Mata atlântica (com ênfase às formações floresta estacional semi decidua e floresta ombrófila mista) e o complexo de biomas do cerrado (Batalha, 2010); as coletas porem, se concentraram em remanescentes de áreas de floresta estacional semidecidua, localizada na Fazenda Experimental do Lajeado, sede da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) da UNESP, onde foram percorridas trilhas já existentes, com o comprimento variando de acordo com o local. Estes locais sofreram atividades humanas no passado recente, com introdução de espécies exóticas, como *Eucalyptus spp*, mas que nos últimos 50 anos vêm sendo preservada, e contam hoje com trilhas estabelecidas pelo Departamento de Ciências Florestais da FCA, com finalidades exclusivas para ensino, pesquisa e atividades de extensão. As coletas realizadas em áreas urbanas se concentraram nas praças e ruas mais próximas do centro da cidade.

A coleta e herborização do material coletado seguiram as recomendações técnicas de Drechsler-Santos (2010). Foram observados substratos como troncos (inclusive os mortos), galhos e raízes expostas, solo e serrapilheira. Os espécimes foram coletados manualmente com o auxílio de faca, fotografados e acondicionados em sacos de papel; foram anotados dados do local, número de coletor, data, substrato, coloração do basidioma, além da coleta de fragmentos para análise molecular (Figura 2).



Figura 2: a) e b) Retirada de material dos basidiomas coletados para análises moleculares

## HERBORIZAÇÃO

Os basidiomas foram colocados em estufa para desidratação, com temperaturas em torno de 50 °C. O material foi guardado em sacos plásticos (polipropileno) com vedação, e está depositado na micoteca do herbário BOTU, da UNESP campus de Botucatu, com duplicatas depositadas no Herbário FLOR, da Universidade de Santa Catarina.

## IDENTIFICAÇÃO

### **Análise morfológica: macroscópica**

Dos basidiomas coletados, ainda em campo, foram observados e anotados dados como modo de fixação no substrato, cor e consistência; do píleo, formato e presença ou ausência de estipe. Em laboratório foram feitas medidas da largura (do substrato a margem), comprimento (distância paralela ao substrato), espessura (distâncias entre as superfícies do basidioma na porção mais próxima da inserção no tronco) e registrados os valores extremos dessas medidas; da superfície abmenial, margem e cor; da superfície himenial, tipo, forma dos poros, número de poros por mm; do contexto e tubos, foram observados e anotados dados de cor, aspecto e espessura.

Essas análises foram feitas a olho nu ou com auxílio de estéreo microscópio LEICA DFC290 com foto documentador.

## **Análise morfológica: microscópica**

Para observação microscópica do material foram feitos cortes histológicos a mão livre, com lâmina de aço inoxidável, de porções do tecido do basidioma (regiões do contexto e tubos, e das superfícies abhimenial e himenial). Os cortes foram colocados em laminas e corados com reagente de Melzer, utilizado para detectar a presença de polissacarídeos integrantes de paredes hifais, basidiósporos e outras microestruturas (Baral, 1987), floxina a 1% (corante citoplasmático) e KOH a 5% (hidratante) (Drechsler, 2010; Torres-Torres & Davalos, 2012). A análise foi amparada pelo uso de microscópio *Zeiss Primo Star* e Olympus BX60 com câmera digital DP72 (com foto documentador) nas objetivas de 40 e 100 vezes, com uso de óleo de imersão próprio. As laminas montadas dessa forma permitiram a observação do sistema hifal do contexto, de elementos estéreis, de basídios e de basidiósporos (Ryvarden, 1991).

## **Técnicas moleculares**

As extrações de DNA dos basidiomas seguiram o protocolo de Doyle & Doyle modificado, cujas etapas, dentre outras, envolvem maceração do tecido fúngico em N<sub>2</sub> líquido, sendo o tampão usado à base de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). As amostras foram submetidas à técnica de PCR em que foram empregados os pares de *primers* ITS1/ITS4, ITS4/ITS5 (White et al., 1990) ou ITS1-F/ITS4-R (Gardes & Bruns, 1993), conservados para a região de rDNA. A amplificação foi realizada em termociclador aplicando-se a seguinte ciclagem: i) desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos; ii) 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos e iii) extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a realização das amplificações, foi realizada eletroforese em gel de agarose (USB) 1,5%, em tampão TBE 1x (Tris-Ácido Bórico-EDTA), por aproximadamente 1h 30min a 80V, utilizando-se o corante Blue Orange Loading Dye (Promega), e visualização dos amplicons em transiluminador com sistema de captura de imagens (*SynGene*). Confirmada a amplificação, procedeu-se a clonagem dos amplicons em vetor plasmidial, utilizando-se do sistema *CloneJET™ PCR Cloning Kit* (Thermo®), em bactérias *Escherichia coli* DH5α competentes (MAX Efficiency® DH5α™ Competent Cells, Invitrogen). Os plasmídeos foram extraídos utilizando-se de

sistema miniprep (Fermentas®), e enviados, juntamente com os primers pJET1.2 *Forward e Reverse Sequencing Primers*, para sequenciamento, o qual foi realizado pelo sistema *BigDye® Terminator v3.1, Cycle Sequencing Kit* em sequenciador automático ABI3500® (*Applied Biosystems*).

Os cromatogramas de sequenciamento obtidos foram comparados visualmente e as sequências alinhadas com o auxílio dos softwares BioEdit (*Bio Edit Sequence Alignment Editor*) e Mega 5.0, de forma a obter as sequências consensos entre as duas fitas de cada isolado. As sequências consensos obtidas foram então comparada pela ferramenta *Blastn* junto à base de dados do NCBI, de forma a obter os alinhamentos com sequências depositadas que apresentassem as maiores porcentagens de identidade/similaridade.

Procedeu-se também uma análise filogenética das sequências obtidas, por *Neighbor Joining*, Máxima parcimônia e Máxima verossimilhança, com 1000 réplicas de *bootstrap*, utilizando-se do software Mega 5.0. O Modelo evolutivo usado foi Kimura-2, calculado pelo próprio *software*.

## ISOLAMENTO

A partir dos basidiomas coletados houve a tentativa de obtenção de culturas puras. Para tal, retiram-se pequenos fragmentos do basidioma, especialmente da porção do contexto e tubos, de maneira asséptica, realizada em câmara de fluxo laminar, com auxílio de uma lamina de aço inoxidável e pinça estéril, que foram inoculados em placas de *Petri* contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) acrescido de cloranfenicol. Alguns fragmentos eram previamente lavados em solução de HClO a 5%, na tentativa de diminuir a contaminação das placas semeadas.

Cada placa foi devidamente identificada e em seguida, acondicionada em estufa incubadora BOD a 27°C.

## DETERMINAÇÃO DOS TÁXONS

Para identificação foi utilizada bibliografia própria, como Fidalgo, O. (1968), Moncalvo e Ryvardeen (1997), Ryvardeen (2004), Gugliotta (2011), Torres-Torres (2012).

As descrições basearam-se em literatura e feitas de acordo com a análise do material coletado.

Os espécimes foram depositados no Herbário MARIA ENEYDA P. K. FIDALGO, pertencente ao instituto de botânica de São Paulo.

## ILUSTRAÇÕES E FOTOGRAFIAS

As fotografias em nível macroscópico foram obtidas com câmera digital SONY DSC-P93A e estéreo microscópio LEICA DFC290. As fotografias em nível microscópico foram obtidas com microscópio OLYMPUS BX60 e câmera digital DP72.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Segundo a análise morfológica foi possível a identificação dos basidiomas ganodermatóides coletados em: *Ganoderma perzonatum* (oito espécimes) e *Ganoderma australe* (dois espécimes), totalizando dez espécimes agrupados em duas espécies.

Os basidiomas de *G. australe* foram encontrados em área de mata, em substrato morto, em elevado estado de decomposição, onde haviam outras colônias de outros fungos. Os basidiomas de *G. pernozatum* foram encontrados em área urbana, exclusivamente, sob substrato vivo (apenas um espécime foi encontrado em substrato arbóreo cortado) e quase todas as ocorrências se deram em árvores da família Fabaceae, espécie *Caesalpinia peltophoroides*, sendo apenas um espécime encontrado na espécie arbórea *Tabebuia avellaneda*. (Tabela 1).

TABELA 1: Dados de campo das coletas, número de tombo, coordenadas geográficas e espécie morfológica identificada.

Nº DE COLETOR	Nº DE TOMBO	SUBSTRATO	ÁREA DE COLETA	COORDENADAS GEOGRAFICAS	ESPÉCIE
<b>MF 001</b>	SP445984	Árvore viva <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	urbana	22°53'32.67"S 48°26'49.64"O	<i>G. pernozatum</i>
<b>MF 003</b>	SP445985	Árvore viva <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	urbana	22°53'14.55"S 48°26'39.04"O	<i>G. pernozatum</i>
<b>MF 004</b>	SP445986	Árvore viva <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	urbana	22°53'14.55"S 48°26'39.04"O	<i>G. pernozatum</i>
<b>MF 005</b>	SP445987	Árvore viva <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	urbana	22°53'22.99"S 048°26'11.94"O	<i>G. pernozatum</i>
<b>MF 009</b>	SP445988	Árvore morta	fragmento florestal	22 ° 50' 16.9 "S 048° 25' 31.7"O	<i>G. australe</i>
<b>MF 012</b>	SP445989	Árvore viva <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	urbana	22°53'17.79"S 048°26'44.51"O	<i>G. pernozatum</i>
<b>MF 013</b>	SP445990	Árvore viva <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	urbana	22°53'32.67"S 048°26'49.64"O	<i>G. pernozatum</i>
<b>MF 014</b>	SP445991	Árvore viva <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	urbana	22°53'25.54"S 048°26'48.94"O	<i>G. pernozatum</i>
<b>MF 015</b>	SP445992	Árvore viva <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	urbana	22°53'24.63"S 48°27'7.43"O	<i>G. pernozatum</i>
<b>MF 024</b>	SP445993	árvore morta	fragmento florestal	22°50'25.4 "S 048°25'32.7"O	<i>G. australe</i>

## Descrição dos Táxons

***Ganoderma australe*** (Fr.) Pat., Bulletin de la Société Mycologique de France 5: 71 (1889)

**Basiônimo:** *Polyporus australis* Fr., Elench. Fung. 1: 108, 1828.

= *Polyporus tornatus* Pers., in Freyc., Voy. Uranie. Bot. 5: 173, 1827.

≡ *Ganoderma tornatum* (Pers.) Bres., Hedwigia 53: 55, 1912. ≡ *Fomes australis* (Fr.) Cooke, Grevillea 14(69): 18, 1885.

≡ *Elfvingia australis* (Fr.) G. Cunn., Bull. N.Z. Dept. Sci. Industr. Res., Pl. Dis. Div. 164: 256, 1965.

= *Ganoderma lipsiense* (Batsch) G.F. Atk., Annls mycol. 6: 189, 1908.

= *Ganoderma applanatum* f. *australe* (Fr.) Bourdot & Galzin, Bull. trimest. Soc. mycol. Fr. 41: 184, 1925.

≡ *Ganoderma applanatum* subsp. *australe* (Fr.) Bourdot & Galzin, Bull. trimest. Soc. mycol. Fr. 41: 184, 1925.

### Figuras: 3, 4 e 5.

**Basidioma** Perene, séssil, pileado, aplanado e semicircular, duro quando seco. Dimensões: 14 – 20 cm x 4-12 cm x 14–23 cm. **Superfície Abhimental** lisa de cor marrom escuro, concentricamente sulcado, glabra, lisa, não lacada, com cutícula negra. **Borda** grossa, lisa, reta e inteira, com a mesma cor da superfície abimental; **Superfície Himental** poróide (6-8 poros por mm) com poros circulares a angulares, de diâmetro variando entre 0,091mm e 0,097mm; dissepimento inteiro de espessuras entre 0,059mm e 0,075mm. Cor branca quando fresca até ligeiramente marrom quando seca. **Contexto** fibroso de cor marrom, tubos estratificados castanho-escuros, mais escuros que a superfície. **Sistema hifal** trimítico; hifas esqueléticas com parede engrossada sem ramificação, sendo a estrutura predominante no micélio (diâmetro 3,5 - 5 µm); hifas generativas hialinas de paredes finas, com presença de ansas (diâmetro 1-3 µm); hifas conectivas com forma arboriforme (diâmetro 1,5-3 µm). **Elementos estéreis** não observados. **Basídios** não observados. **Basidiósporos** elipsóides, truncados, de parede engrossada e ornamentada com tamanho variando entre 6-8 x 5-7µm.

**Substrato:** árvore morta em área de mata

***Ganoderma perzonatum*** Murrill, North American Flora 9 (2): 121 (1908)

**Figuras:** 6,7, 8 e 9.

**Basidioma** anual, pileado, séssil, aplanado e semicircular, cujos primórdios apresentam-se unguilados. Duro quando seco. Dimensões: 3-15cm x 5-20cm x 4-6 cm. **Superfície Abmenial** ora lisa, ora sulcada, ora com elevações, lacada cuja coloração varia do vermelho escuro ao branco pálido. **Borda** grossa, lisa, ora reta e inteira ora com reentrâncias não muito profundas, cuja coloração varia entre branco e creme. **Superfície Himenial** poróide (5-8 poros por mm) com poros angulares a circulares, de diâmetro variando entre 0,083mm e 0,091mm. De cor branca a creme, com dissepimento inteiro com espessuras em torno de 0,04mm a 0,67mm. **Contexto** fibroso de cor marrom, com faixas resinosas ao longo da estrutura; tubos ausentes em espécimes ainda em estágio de primórdio, mas quando presentes são de cor marrom escura, de tamanho variando entre 0,4 a 0,75cm. **Sistema hifal** dimítico; hifas esqueléticas com parede engrossada e coloração amarelada sem ramificação, sendo a estrutura predominante no micélio (diâmetro 6-8,5  $\mu\text{m}$ ); hifas generativas hialinas com parede engrossada e com presença de anças (diâmetro 1-3,5  $\mu\text{m}$ ); **Elementos estéreis** não observados. **Basídios** não observados. **Basidiósporos** elipsóides, truncados, de parede engrossada e ornamentada, com coloração amarelada com tamanhos variando entre 5-9 x 4-6  $\mu\text{m}$ .

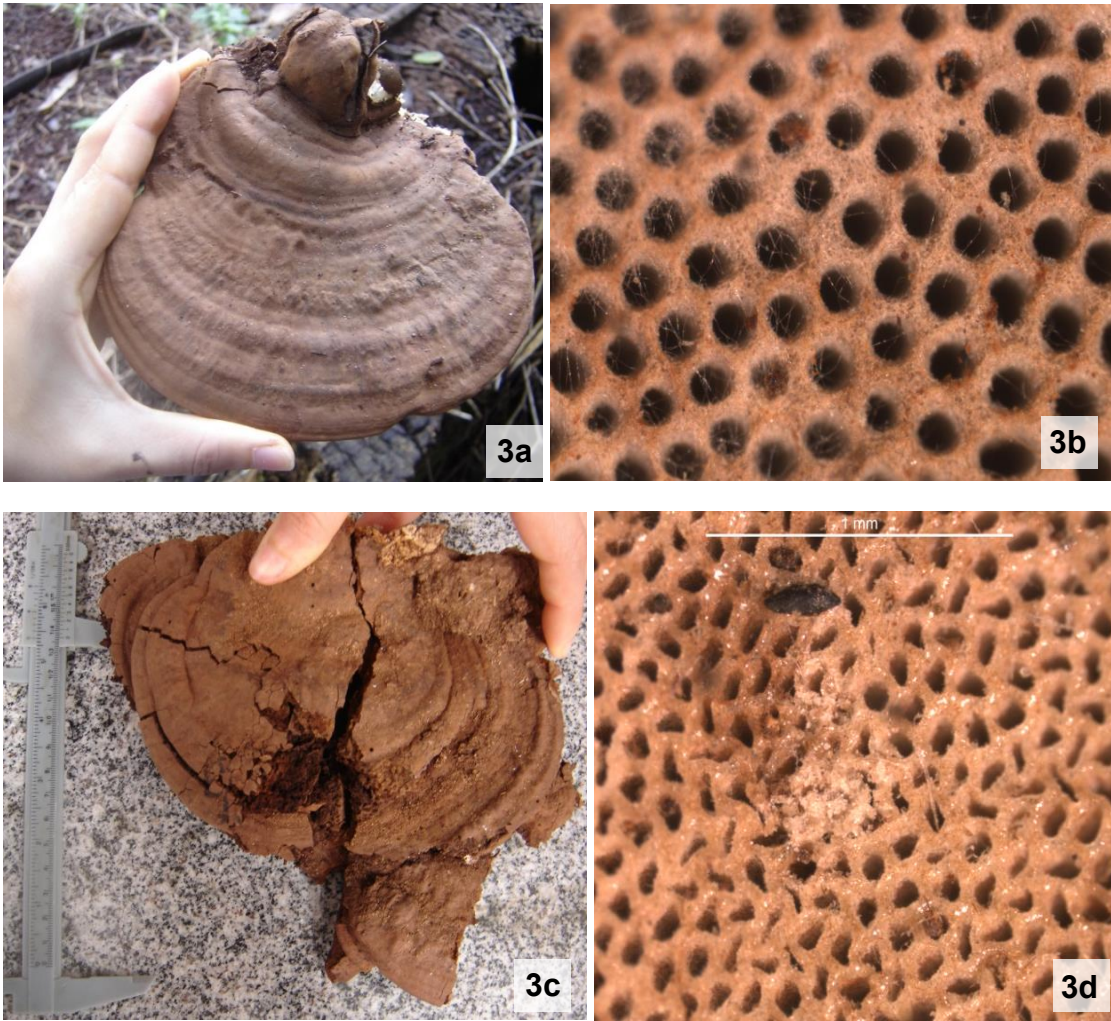
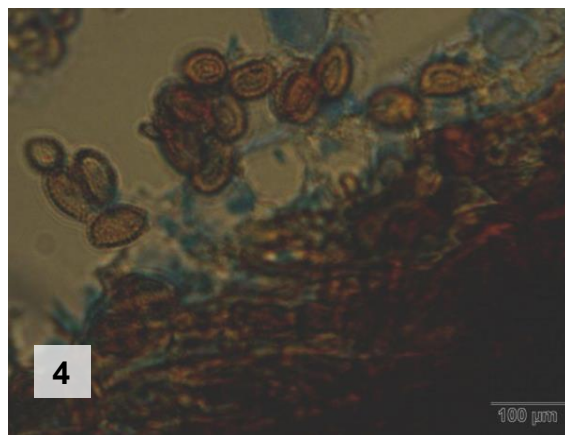


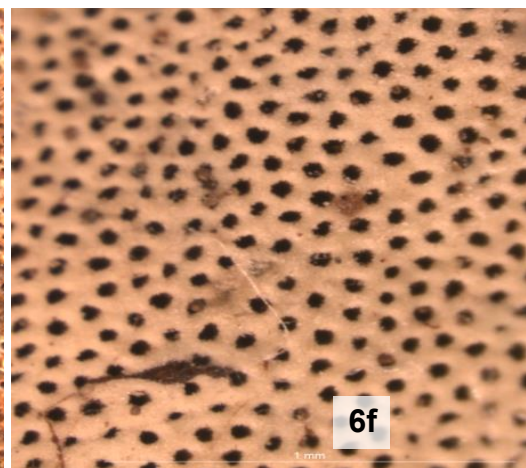
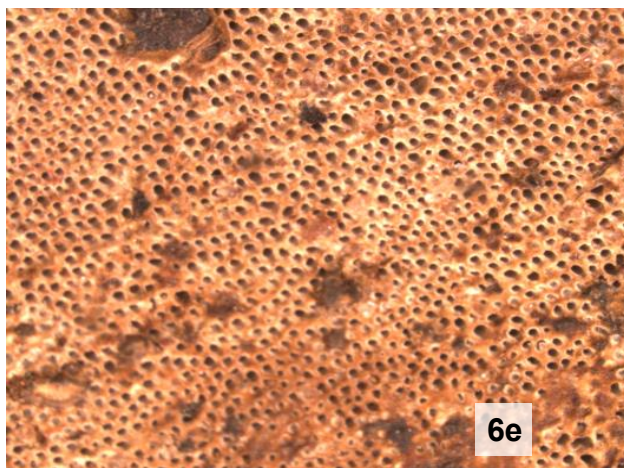
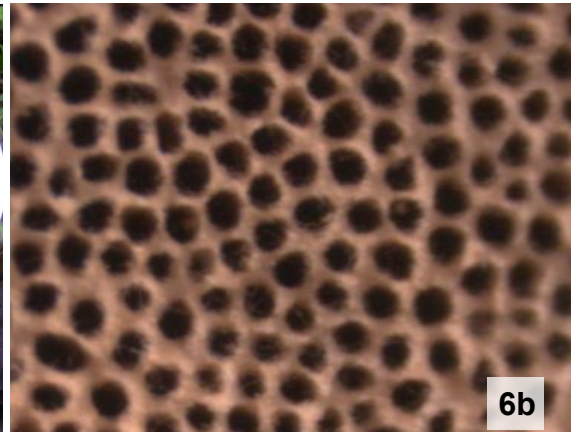
Figura 3: Aspecto macroscópico do basidioma (a) e (c) e da superfície himenial.(b) e (d) de *Ganoderma australe*.



Figuras 4: Basidiósporos de *Ganoderma australe* (Coloração: lactofenol azul- algodão).



Figura 5: Tubos e contexto de contexto do basidioma de *Ganoderma australe*.



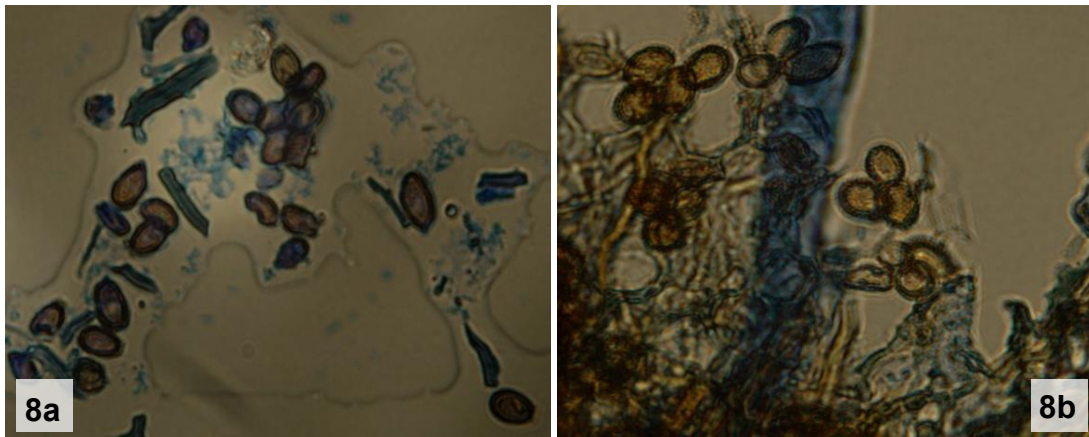
Continua....



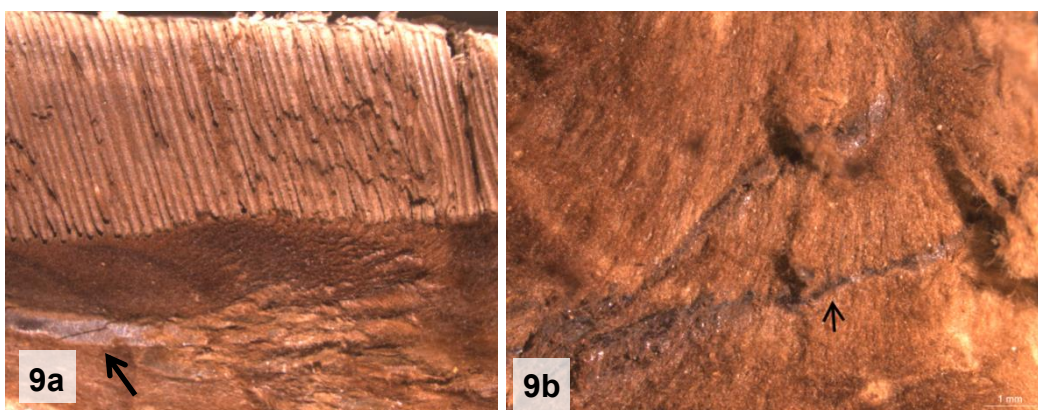
Figura 6: Aspecto macroscópico do basidioma (a),(c),(e) e (g) e da superfície himenial. (b),(d),(f) e (h) de *Ganoderma perzonatum*



Figuras 7 (a), (b), (c), e, (d): Primórdios de basidiomas coletados de *Ganoderma perzonatum*



Figuras 8: Basidiósporos de *Ganoderma perzonatum* (Coloração: lactofenol azul- algodão).



Figuras 9: (a) e (b) Estruturas resinosas no contexto do basidioma de *Ganoderma perzonatum*.

## CULTURAS PURAS

As tentativas de isolamento aconteceram com todos os fungos coletados.

Não houve contaminação por bactérias, porém, grande parte dos isolados apresentou desenvolvimento micelial acelerado, o que direcionou o olhar para possíveis contaminações causadas por outros fungos. O aspecto do micélio crescido em praticamente a totalidade dos isolados era cotonoso, de cor branca, que surgia na placa, em média, uma semana após a inoculação. Em aproximadamente quinze dias, a placa estava recoberta com micélio de coloração escura e esporos de cor verde (Figura 10).

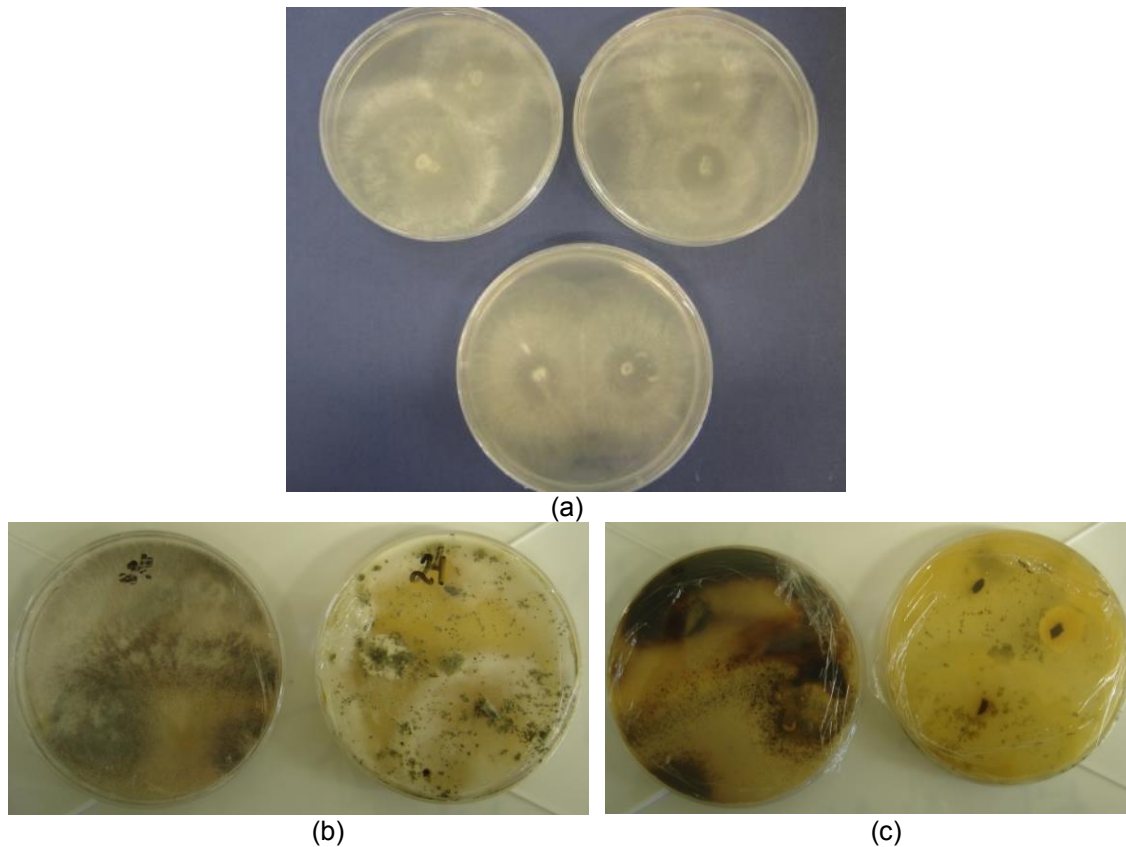


Figura 10: (a) Placas com início de desenvolvimento micelial de parte das amostras usadas nas tentativas de isolamento; (b) e (c) Placas com contaminantes.

Após visível crescimento e sucessivos subcultivos do material crescido nas placas das tentativas de isolamento, fez-se um micro cultivo (Figura 11) para a visualização da porção micelial em lâmina corada com Lactofenol-azul-algodão e observou-se a ausência de ansas. Os micro cultivos também apresentaram esporulação em quase todas as placas de um mesmo material, identificado como Zigomiceto, o que ratificou a hipótese de contaminação por outros fungos.

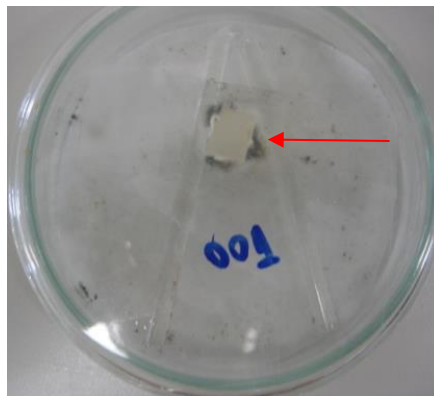


Figura 11: Placa de micro cultivo de material oriundo das placas de tentativas de isolamento. Detalhe para a esporulação de possível contaminante.

A grande dificuldade talvez tenha sido a contaminação oriunda dos próprios basidiomas; Mesmo com o local de trabalho sendo asséptico, incluindo o fato de que o isolamento fora feito em câmara de fluxo laminar, a contaminação oriunda do material ambiental não conseguiu ser vencida.

O meio de cultura (batata, dextrose e ágar) foi preparado com adição de cloranfenicol (antibiótico), mas sem a adição de antifúngicos, o que também pode ter favorecido o aparecimento de micélios contaminantes em detrimento do micélio do isolado.

Diante disso, houve a impossibilidade de isolamento dos organismos coletados, havendo insucesso no cultivo de culturas puras.

## IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Em princípio as amplificações não estavam sendo bem sucedidas; inúmeras tentativas vinham sendo feitas sem resultado. Com a troca da enzima *Taq polimerase* e adição no *mix* da PCR de DMSO 30% (aditivo orgânico que melhora a amplificação), as amplificações deram bons resultados.

As amplificações de materiais extraídos foram bastante satisfatórias (Figura 12), assim como as clonagens em vetor plasmidial, técnicas estas que foram aperfeiçoadas no transcorrer do projeto.

## GeneRuler 100 bp DNA Ladder

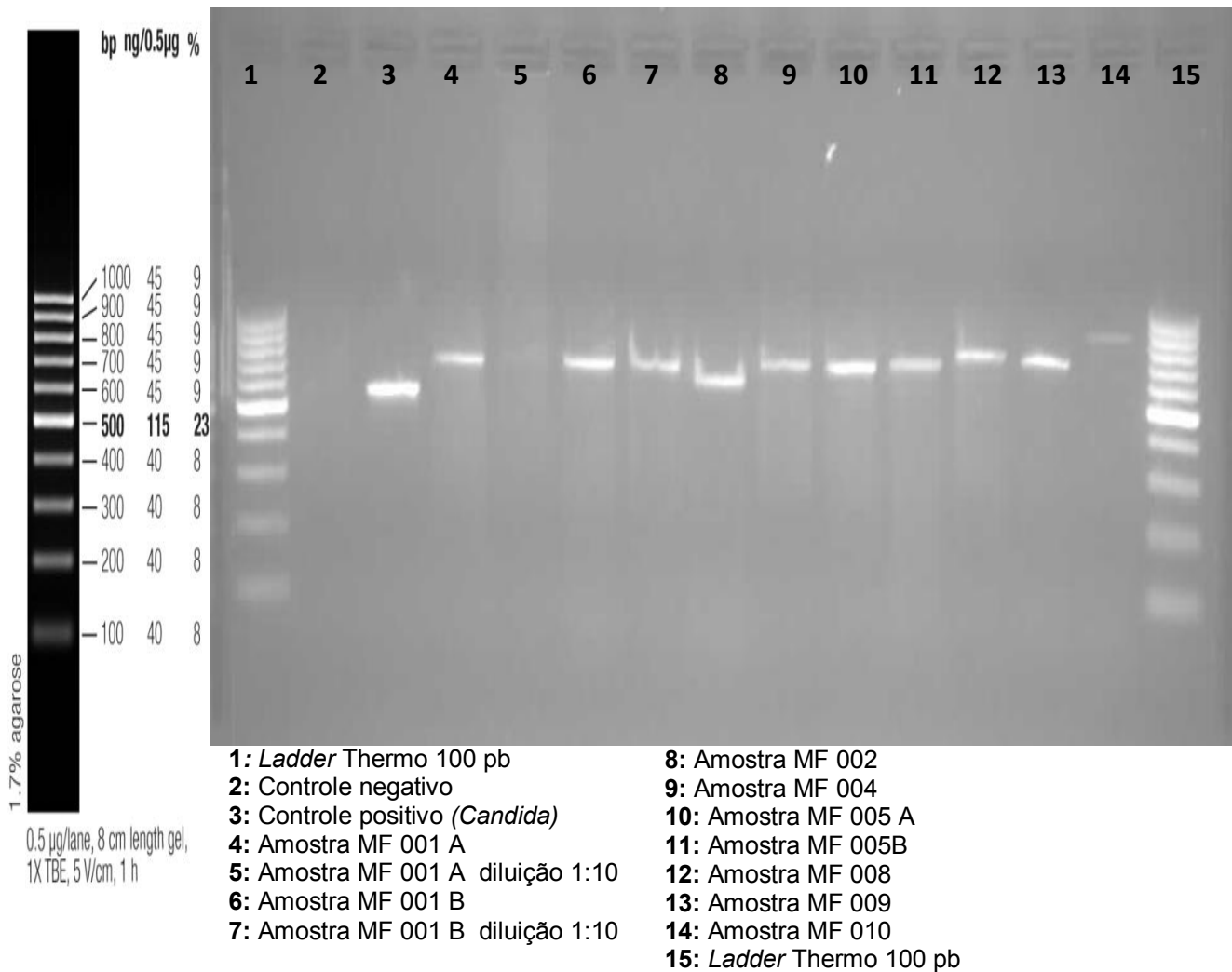


Figura 12: Gel de agarose com parte das amostras amplificadas. Legenda: a) 1 a 9 e b) 1 a 13: bandas dos *amplicons* do material ambiental. M - marcador molecular de 100pb *Low Mass Ladder* Invitrogen.

De dez amostras submetidas às técnicas moleculares apenas uma não teve amplificação positiva (amostra identificada como *G. australe* segundo a morfologia), já que o *amplicon* não foi visualizado em gel de agarose. O sequenciamento foi viável para todas as amostras amplificadas.

As comparações das sequências obtidas pela ferramenta Blastn junto às bases de dados confirmou o gênero *Ganoderma* para todos os materiais, bem como a identificação morfológica de *G. australe*. No entanto, em relação aos materiais identificados morfológicamente como *G. perzonatum*, as análises moleculares indicaram maiores porcentagens de identidade com as espécies

*Ganoderma parvulum* (dois espécimes), *G. multiplicatum* (seis espécimes) (Tabela 2).

TABELA 2: Dados de identificações moleculares de *Ganoderma* spp, com número de coletor, identificação morfológica, porcentagens da identidade e respectivos acessos Genbank.

Número de coletor	Identificação Morfológica	Identificação Molecular	Identidade	Acesso Genbank
<b>MF001</b>	<i>Ganoderma perzonatum</i>	<i>Ganoderma parvulum</i>	99%	JX310821
<b>MF003</b>	<i>Ganoderma perzonatum</i>	<i>Ganoderma multiplicatum</i>	99%	JX310823
<b>MF004</b>	<i>Ganoderma perzonatum</i>	<i>Ganoderma parvulum</i>	97%	JX310821
<b>MF005</b>	<i>Ganoderma perzonatum</i>	<i>Ganoderma multiplicatum</i>	99%	JX310823
<b>MF009</b>	<i>Ganoderma australe</i>	<i>Ganoderma australe</i>	97%	FR821768
<b>MF012</b>	<i>Ganoderma perzonatum</i>	<i>Ganoderma multiplicatum</i>	98%	JX310823
<b>MF013</b>	<i>Ganoderma perzonatum</i>	<i>Ganoderma multiplicatum</i>	99%	JX310823
<b>MF014</b>	<i>Ganoderma perzonatum</i>	<i>Ganoderma multiplicatum</i>	96%	JX310823
<b>MF015</b>	<i>Ganoderma perzonatum</i>	<i>Ganoderma multiplicatum</i>	98%	JX310823
<b>MF024</b>	<i>Ganoderma australe</i>	Não amplificado	-----	-----

Esta incongruência nas identificações morfológicas e moleculares pode ser explicada pelo fato de que *G. perzonatum* não apresenta ainda sequências depositadas nas bases de dados consultadas. Além disso, algumas seqüências mostraram valores de identidade relativamente baixa (96% e 97%) o que pode ter contribuído para a disparidade na identificação. Frente a isso, vale destacar também o que sugere Koljalg, *et al*, 2013, os quais enfatizam que os valores de similaridades para definição de relações interespecífica ou intra-específica podem variar de acordo com o grupo de organismos e da base de dado disponível. Outro fato também é que, semelhante ao que ocorre em alguns outros grupos, a região ITS rDNA pode não ser totalmente discriminatória para espécies do gênero.

As sequências foram depositadas no banco de dados GenBank seguindo a identificação morfológica, ou seja, como *Ganoderma perzonatum* (Tabela 3).

TABELA 3: Sequencias depositadas no banco de dados Genbank

**MF  
001**

ACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGTTCTGACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTG  
CACTTACTGTGGGCTTCAGATCGTAAAACGCGGGTCCCTTTACCGGGCTTGCGGGAGCTGTCTGTGCCTGCGTTTATCACAACTCTATAA  
AGTATCAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATACAATTTAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA  
TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTT  
GAGTGTATGAAATCTTCAACCTGCAAGCTTTTTGTGGTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTGGCCATTCTGGTGGCCCTCTTAAA  
TGCATTAGCTTGGTTCCCTTGCAGATCGGCTCTCGGTGTGATAATGTCTACACTGCGACCGTGAAGCTTTGGCGAGCTTCTAACTGTCTCAGT  
TGGAGACAACCTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAAGCATATCAATA

**MF  
003**

GATCATTATCGAGTTTTGACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCCTTACTGTGG  
GCTTCAGATCGTAAAACGCGGGCTTTATCGGGCTCGCGGAGCGTGTCTGTGCCTGCGTTTATCACAACTCTATAAAGTATCAGAATGTGTA  
TTGCGATGTAACGCATCTATACAACCTTTAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG  
AATTGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTATGAAATC  
TTCAACCTACAAGCTTTTGCAGTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTGGCCCTTCTTAAATGCATTAGCTTGGTT  
TGAGTGTATGAAATCTTCAACCTGCAAGCTTTTTGTGGTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTGGCCCTTCTTAAATGCATTAGCTTGGTT  
CCTTGGCAATCGGCTCTCGGTGTGATAATGTCTACCGCCGACCGTGAAGCGTCTGGCGAGCTTCTAACCGTCTCAGTTGGAGACAGCTTT  
ATGACCTCTGACCTCAAAT

**MF  
004**

ACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGTTCTGACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTG  
CACTTACTGTGGGCTTCAGATCGTAAAACGCGGGTCCCTTTACCGGGCTTGCGGGAGCGTGTCTGTGCCTGCTTTATCACAACTCTATAA  
AGTATCAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATACAACCTTTAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA  
TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTT  
TGAGTGTATGAAATCTTCAACCTGCAAGCTTTTTGTGGTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTGGCCCTTCTTAAATGCATTAGCTTGGTT  
AATGCATTAGCTTGGTTCCCTTGCAGATCGGCTCTCGGTGTGATAATGTCTACACTGCGATTCTTGGCGTTTGGCGAGCTTCTAACTGTCTC  
A

**MF  
005**

GCGGAAGGATCATTATCGAGTTTTGACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACT  
TACTGTGGGCTTCAGATCGTAAAACGCGGGCTTTATCGGGCTCGCGGAGCGTGTCTGTGCCTGCGTTTATCAAACCTCTATAAAGTATCAG  
AATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATACAACCTTTAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA  
GTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCA  
TGAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGCAGTTGTAGGCTTGGATGGAGGCTTGTGGCCCTTCTTAAATGCATTAGCT  
TGGTTCCCTTGGCAATCGGCTCTCGGTGTGATAAGTCTACCGCCGCMCCGTGTTGCGTCTGGCGAGCTTCTAACCGTCTCAGTTGGAGACA  
GCTTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTWGA

**MF  
009**

GACATTATCGAGTTGACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAYGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTG  
GGTTTTACGGGTCGTAAAACGCGGGCTCGTTTATCGGGCTTGTGAGCGCACTTGYTGCCTGCGTTTATCACAACTCYATAAAGTATTAGA  
ATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATACAACCTTTAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA  
AGTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTG  
TCATGAAATCTTCAATCTAYAAGCTTCTTATKTGARKTTGGAAGGCTGGACTTGGAGGCTTGGCCGGCTTTACCGGGTTCGCTTCTTAA  
AATGMATAASTTGGYTCCTTGGCGAATCGCTTGGCGGTGGGAAAAGGCCACCCCGACCCGTAAGTGTGTGGCCCAACTTCTACC  
GTCTTCKTACARARACCACTTAACTCTCK

MF  
012

```
CGAGTTTTGACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTGGGCTTCAGA
TCGTGAAACGGGCCCTTTATCGGGCTCGCGGAGCGTGTCTGTGCCTGCGTTTATCACAACTCTATAAAGTATCAGAATGTGTATTGCGAT
GTAACGCATCTATATACAACTTTAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTGCATGAAATCTTCAAC
CTACAAGCTTTGCGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTGCGCCGTTCTTGGTGGGCTCCTCTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTG
CGAATCGGCTCTCGGTGTGATAATGTCTACGCCGCGACCGTGAAGCGTCTGGCGAGCTTCTAACCGTCTCAGTTGGAGACAGCTTTATGA
CCTCTGACCTCAAATCAGG
```

MF  
013

```
CCKGCAGAAGGATCATTATCGAGTTTTGACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCA
CTTACTGTGGGCTTCAGATCGTAAACGGGCCCTTTATCGGGCTCGCGGAGCGTGTCTGTGCCTGCGTTTATCACAACTCTATAAAGTATCA
GAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACTTTAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGAGAATTCAGTGAATCATCTAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCA
TGAATCTTCAACCTACAAGCTTTGCGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTGCGCCGTTCTTGGTGGGCTCCTCTAAATGCATTAGCT
TGGTTCCTTGCAGATCGGCTCTCGGTGTGATAATGTCTACGCCGCGACCGTGAAGCGTCTGGCGAGCTTCTAACCGTCTCAGTTGGAGACAG
CTTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
```

MF  
014

```
CCTGCGGAAGGATCATTATCGAGTTTTGACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCAMGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGC
ACTTACTGTGGGCTTCAGATCGTAAACGGGCCCTTTATCGGGCTCGCGGAGCGTGTCTGTGCCTGCGTTTATCACAACTCTATAAAGTATC
AGAATGTGTATTGCGATGAAACGCATCTATATACAACTTTAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AAGTAATGTGAATTGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGT
CATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTGCGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTGCGCCGTTCTTGGTGGGCTCCTCTAAATGCATTA
GCTTGGTTCCTTGCAGATCGGCTCTCGGTGTGATAATGTCTACGCTKTGTCTYTTGCGGTCTGGCGAGCTTCTAACCGTCTCAGTTGGAGCTC
GTTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
```

MF  
015

```
GGATCATTATCGAGTTTTGACTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTG
GGCTTCAGATCGTAAACGGGCCCTTTATCGGGCTCGCGGAGCGTGTCTGTGCCTGCGTTTATCACAACTCTATAAAGTATCAGAATGTGTA
TTGCGATGTAACGCATCTATATACAACTTTAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTGCATGAAATCTT
CAACCTACAAGCTTTGCGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTGCGCCGTTCTTGGTGGGCTCCTCTAAATGCATTAGCTTGGTTCCT
TGCGAATCGGCTCTCGGTGTGATAATGTCTACGCCGCGACCGTGTGC--TCTGGCGAGCTTCTAACCGTCTCAGT-GGAGACAGCTTTA
```

Três árvores filogenéticas (Figuras 13 a 15) foram construídas a partir das sequências alinhadas no mesmo software utilizado na edição (MEGA 5), com teste de *bootstrap* com 1000 réplicas, cujos valores nos ramos mais significativos foram destacados. Em todas as construções usou-se a espécie *Amauroderma spp* obtida do GenBank (acesso:JX310860.1) como grupo externo, assim como incluiu-se também outras três sequências do mesmo banco de dados, representantes das espécies *G. australe*, *G. multiplicatum* e *G. parvulum*.

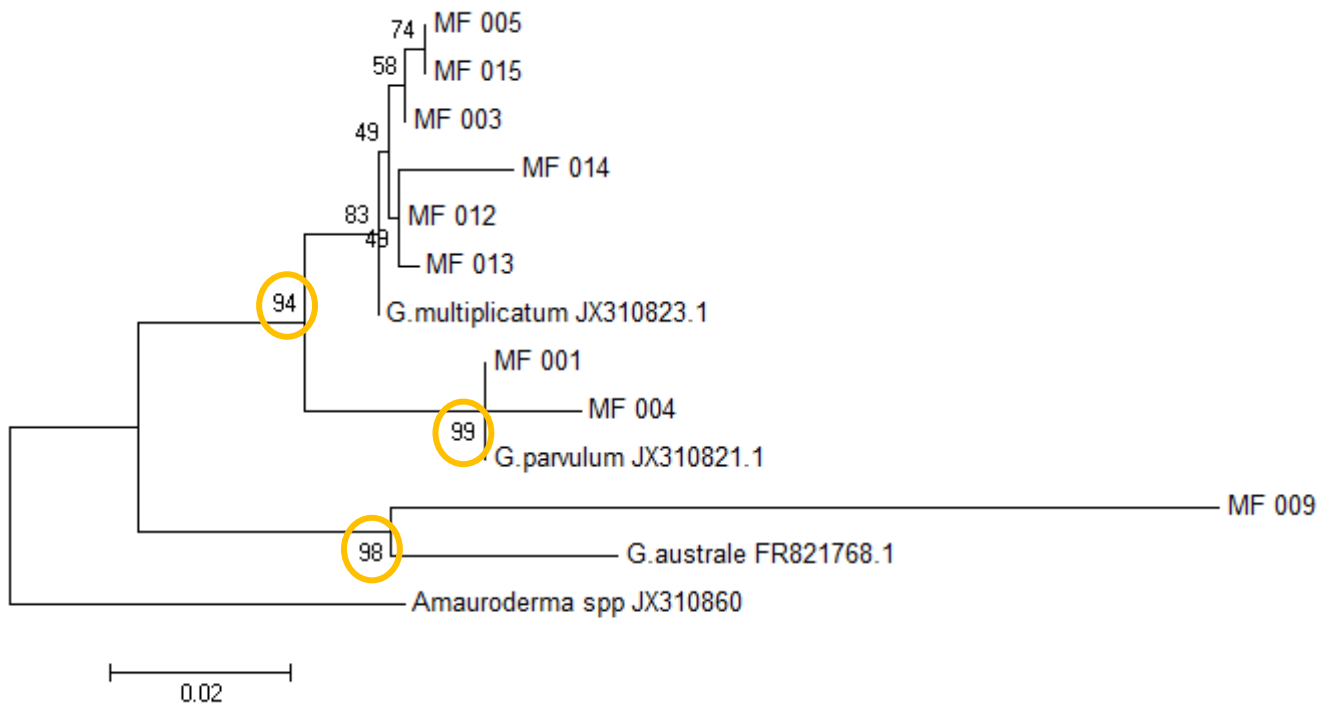


Figura 13: Árvore filogenética (máxima verossimilhança) com as espécies de *Ganoderma* da região de Botucatu, obtida pela análise de sequência de ITS rDNA.

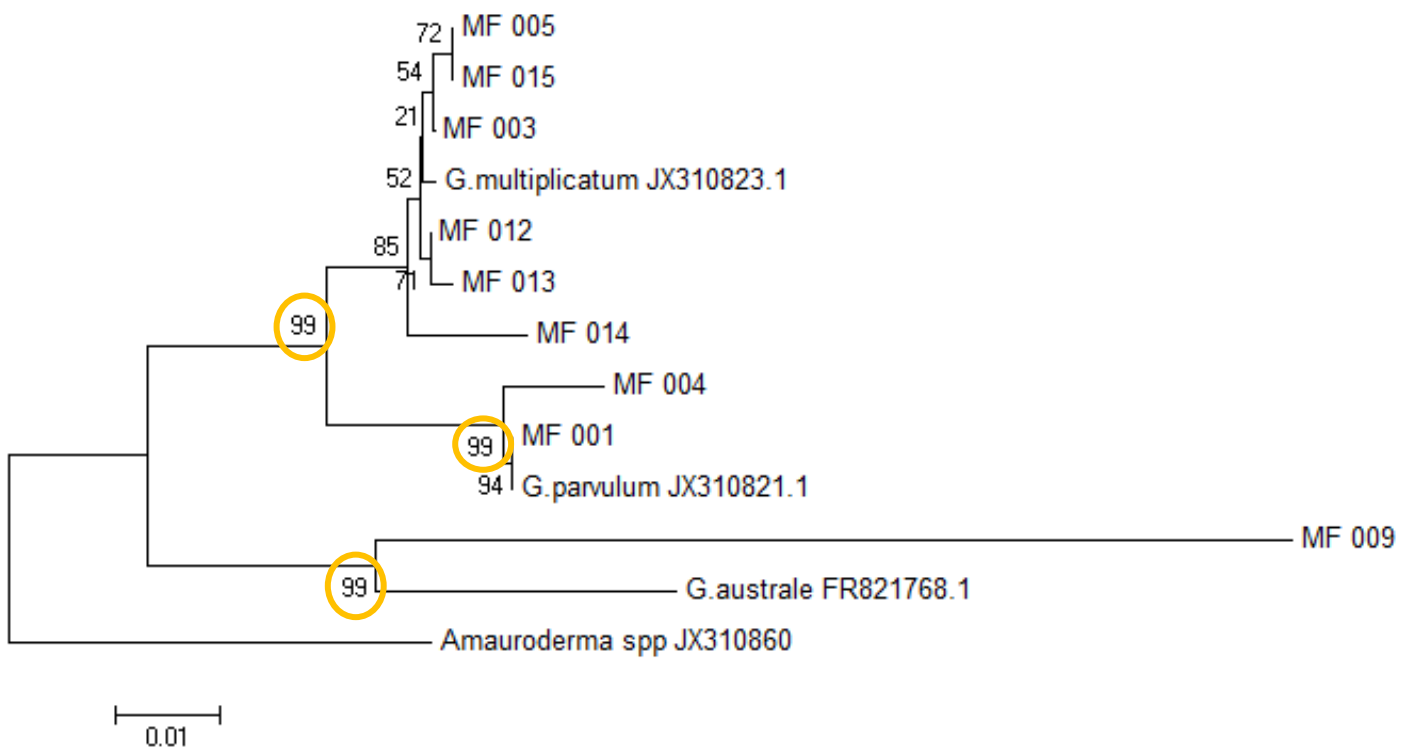


Figura 14: Árvore filogenética (*Neighbor Joining*) com as espécies de *Ganoderma* da região de Botucatu, obtida pela análise de sequência de ITS rDNA.

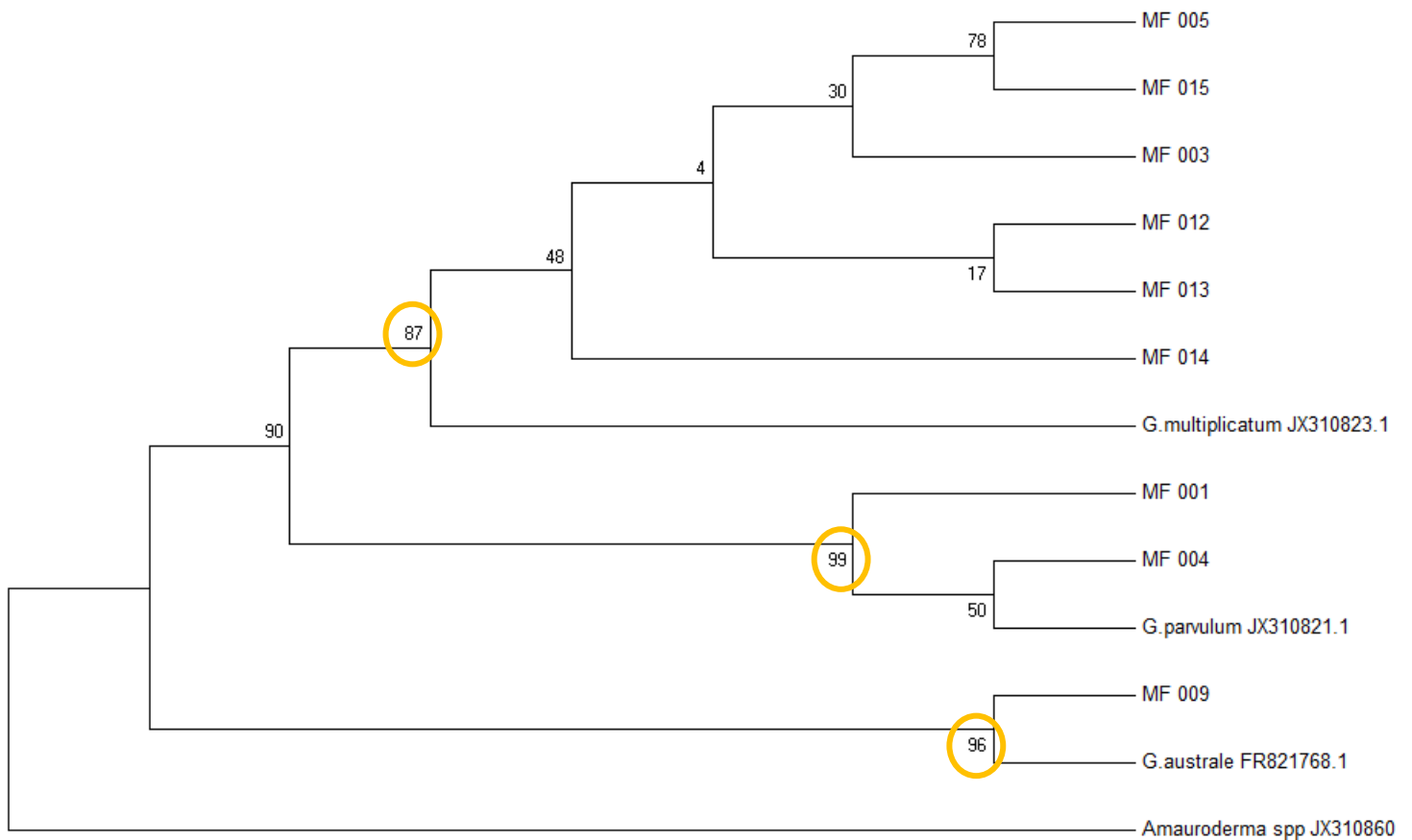


Figura 15: Árvore filogenética (Máxima parcimônia) com as espécies de *Ganoderma* da região de Botucatu, obtida pela análise de sequência de ITS rDNA.

A partir da topologia obtida nas árvores, pode-se confirmar que o material MF 009 é identificado morfológicamente e molecularmente como *G. australe* representa um táxon bem definido e separado dos demais. No entanto, os demais organismos aqui avaliados, identificados morfológicamente como *G. perzonatum*, aparentam representar dois grupos distintos: um mais próximo filogeneticamente de *G. multiplicatum* e outro mais próximo de *G. parvulum*.

O indivíduo MF 014, também identificado molecularmente como *G. multiplicatum* apresenta uma topologia ligeiramente afastada dos demais indivíduos desta espécie. De fato, este genótipo, cuja identidade com a espécie *G. multiplicatum* é de apenas 96%, pode representar um novo táxon, ainda não depositado nas bases de dados.

Nem sempre uma árvore de gene, nesse caso de ITS, reflete a árvore da espécie. Nesse sentido, a região pode ter baixa taxa evolutiva para *Ganoderma* spp, o que explicaria o fato de indivíduos identificados morfologicamente como *G. perzonatum* possuírem sua sequência ITS altamente similar (~99%) com sequências depositadas para as espécies *G. multiplicatum* e *G. parvulum*. Assim, a região ITS talvez não seja a mais indicada para se resolver relações de parentesco dentro do gênero *Ganoderma*. Além disso, o uso de uma única região não permitiu discriminar especiação de polimorfismo intra específico; isto poderá ser alcançado por análises de sequenciamento de multi loci, investigando outras regiões gênicas além das sequências codificadoras de rRNA disponíveis nos bancos de dados.

O uso de caracteres morfológicos poderia auxiliar a análise filogenética aqui realizada, com caracteres adicionais, contudo, não se observou variação de estado de caracteres morfológicos utilizados na chave de identificação de espécie. Ou seja, todos os indivíduos aqui amostrados apresentavam os mesmos estados de caráter para todas as características morfológicas avaliadas, ou seja, não foi observado polimorfismo morfológico. O uso de caracteres moleculares, no entanto, se mostrou mais adequado para a análise, uma vez as sequências espaçadoras internas, ITS1 e ITS2, aqui sequenciadas, apresentam taxa de evolução neutra, possuindo, portanto um polimorfismo neutro que pode ser usado em inferências filogenéticas.

O fato de não haver sequências depositadas nos bancos de dados para *G. perzonatum*, pode ter influenciado nas topologias das árvores. Sendo assim, é preciso que sequências do espécime tipo desse táxon estejam a disposição nos bancos de dados para que possam ser comparadas com as sequências obtidas. Sendo assim, como perspectiva de continuação deste trabalho, espera-se obter um espécime tipo desta espécie em herbário fiel depositário para extração de DNA e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2.

O que nos chama atenção aqui é o fato de que indivíduos morfologicamente pertencentes a uma espécie se agrupem com duas outras espécies distintas, o que como já citado, pode indicar uma inadequação do marcador molecular utilizado. Porém, como a região ITS vem sendo muito

usada para diferenciação de espécies no reino Fungi, já sendo apontada como região *barcoding* (Schoch *et al*, 2012), não podemos também descartar a possibilidade de que o reconhecimento morfológico de espécie pode não representar grupos de espécies reais, sendo, algumas vezes, um conceito artificial. Para tentar resolver tal impasse é preciso uma avaliação do conceito biológico de espécie, no sentido de encontrar os limites da espécie, através da realização de intercruzamentos experimentais para se avaliar a existência de isolamento reprodutivo, o que necessita de informações moleculares, por exemplo, a respeito dos loci *mating types* destas espécies.

Além de se testar o conceito biológico de espécie para a validação das espécies morfológicas de *Ganoderma* spp, há também a necessidade de se testar o conceito filogenético de espécie, pois duas espécies distintas podem até manter a capacidade de intercruzamento, porém não o realizam na natureza (intercruzamento potencial x intercruzamento real), ou seja, apenas uma análise de multi loci revelaria se estas espécies estão ou não trocando alelos na natureza (Taylor, 2000).

O presente trabalho abriu novas frentes de estudo, mostrando a necessidade de se aprofundar os estudos morfológicos e moleculares: mais coletas de campo, mais genes analisados, além utilização de novas técnicas como as técnicas de Radseq (Daveyand & Blaxter, 2011), muito usadas para a busca de marcadores moleculares do tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*) para distinção de populações ou espécies.

Para o Estado de São Paulo, há trabalhos sobre diversidade de *Ganoderma* spp que indicam a ocorrência do gênero em áreas litorâneas e/ou no perímetro do município de São Paulo capital e grande São Paulo (Jesus, 1993, Gugliotta *et al*, 2010, Gugliotta *et al*, 2011 ); Para o interior, os estudos se concentraram na região noroeste do estado (Abrahão *et al*, 2009). Entretanto, o conhecimento deste grupo ainda é escasso; e não só sobre a diversidade de *Ganoderma* spp, mas também com relação ao conhecimento da micobiota. Em muitas regiões do estado de São Paulo, incluindo especificamente a região do Centro oeste paulista, muito pouco se sabe sobre a diversidade fungos poliporóides incluindo os fungos ganodermatóides.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise molecular de outras regiões gênicas junto com morfologia de amostragem mais ampla é necessária para a corroboração dos dados e elucidação taxonômica do grupo.

Em âmbito geral, o uso de técnicas de identificação molecular, através da análise de DNA, possui a vantagem de ser um processo altamente sensível, exigindo quantidades mínimas de DNA, e que não está sujeita a variações fenotípicas das espécies, à ação do ambiente, ou ao estágio de desenvolvimento do fungo dentre outros fatores que possam alterar a morfologia do organismo. Porém, ainda é um procedimento caro, desde os reagentes usados para execução da técnica até a dependência dos equipamentos específicos, como termociclador e sequenciador.

Importante ressaltar também a necessidade e importância de se aprofundar o conhecimento destes organismos pelas metodologias clássicas, de macro e micro morfologia, observações de campo, e literaturas já existentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAO, M.C. 2009. **Estudo da diversidade de basidiomicetos Poliporóides de fragmentos florestais Remanescentes do noroeste paulista.2009. 240f.** Dissertação(mestrado) - Universidade Estadual Paulista,UNESP, Instituto de Biociencias, Letras eCiencias Exatas, Sao Jose do Rio Preto, 2009.
- BARAL, H.O. 1987. **Lugol's solution/IKI versus Melzer's reagent.** Mycotaxon 29: 399-450.
- BATALHA, M.A. 2010. **O cerrado não é um bioma.** Biota Neotrop., vol. 11, no. 1
- DAVEYAND, J, W. BLAXTER, M.L. 2011. **RADSeq: next-generation population genetics.** Briefings In Functional Genomics. Vol 9 nº 5: 416- 423.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. 1987. **A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue.** Phytochemical Bulletin, 19:11-15.
- DRECHSLER-SANTOS, E.R.2010. **Diversidade de agaricomycetes lignolíticos no semi-árido Brasileiro.** 2010. 247f. Tese (doutorado em Micologia) - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, 2010.

FIDALGO, O. 1968. **As microestruturas e sua importância na sistemática dos fungos superiores.** Rickia 3: 117-159.

GARDES, M., AND T. D. BRUNS. 1993. **ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts.** Mol. Ecol., 2: 113-118.

GUGLIOTTA, A. M.; FONSECA, M. P.; BONONI, V. L. R. 2010. **Additions to the knowledge of aphyllorphoroid fungi (Basidiomycota) of Atlantic Rain Forest in Sao Paulo State, Brazil.** Mycotaxon 112: 335–338.

GUGLIOTTA, A. M.; POSCOLERE, G. D.; CAMPACCI, T. V. S. 2011. **Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil: Fungos, 10: Ganodermataceae.** Hoehnea, v. 38, n. 4, Dec.

JESUS, M.A. 1993. **Basidiomicetos lignocelulolíticos de Floresta Nativa e de *Pinus elliottii* Engelm do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP.** Hoehnea 20: 119–126

KOLJALG, U; *et al.* 2013. **Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi.** Molecular Ecology, Online ISSN: 1365-294X.

MONCALVO, J.M; RYVARDEN, L. 1997. **A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk.** Synopsis Fungorum, v. 11, p. 1-114.

RYVARDEN, L. 1991. **Genera of Polypores. Nomenclature and Taxonomy.** Oslo, Fungiflora.

RYVARDEN, L. 2004 Neotropical Polypores. Part 1. **Introduction, Ganodermataceae & Hymenochaetaceae.** Synopsis Fungorum, v. 19, p. 1-227.

SCHOCH , C. L.; SEIFERT ,K. A.; HUHDORF, S. ; ROBERT, V.T.;N SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W. 2012. **Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi.** PNAS Early Edition 109 (16): 1-6.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. 2000. **Phylogenetic Species Recognition and Species Concepts in Fungi.** Fungal Genetics and Biology 31, 21–32.

TORRES-TORRES, M. G; GUZMAN-DAVALOS, L. 2012. **The morphology of Ganoderma species with a laccate surfasse.** Mycotaxon, 119: (16 ) 201-216

WHITE, T. J.; T. BRUNS, S. L.; J. W. TAYLOR. 1990. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Eds.: INNIS, M. A., D. H. GELFAND, J. J. SNINSKY, AND T. J. WHITE. Academic Press, Inc., New York, 1990. p. 315-322.



**CAPÍTULO ii - ESTUDO TAXONÔMICO DO  
COMPLEXO *Phellinus piptadeniae*  
(HYMENOCHAETACEAE)**

## INTRODUÇÃO

*Phellinus* Quel. s.l. (*Hymenochaetaceae* Imazeki & Toki, Basidiomycota) é considerado um gênero polifilético (Wagner & Fisher, 2002) e cosmopolita (Ryvarden, 2004), que compreende aproximadamente 180 espécies (Kirk *et al.* 2008), principalmente caracterizado por apresentar basidiomas sésseis perenes e sistema hifal dimítico (Ryvarden, 2004).

*Phellinus piptadeniae* Teixeira é tradicionalmente caracterizado por possuir basidioma aplanado a tríquetro ou ungulado com superfície pilear concentricamente sulcada, glabra, marrom escuro a enegrecido, com rachaduras radiais que formam rimosidades, à medida que o basidioma se torna senil; o contexto apresenta uma linha negra notória na parte superior, os tubos são estratificados e superfície abhimenial poróides, com 4-5 poros/mm. Microscopicamente, se caracteriza pela ausência de setas, basidiósporos ovalados, de paredes espessas; Sistema hifal é dimítico com hifas generativas e esqueletais (Ryvarden 2004).

Esse organismo foi descrito em 1950 por Teixeira como uma espécie parasita especialista em *Piptadenia comunis* Benth. (Fabaceae), sinônimo de *Piptadenia gonoachanta* Mart, popularmente conhecido como pau-jacaré. Além da especificidade deste fungo com a espécie de planta em particular, Teixeira (1950) destaca que embora o fungo tenha sido registrado por ele apenas para Mata Atlântica do estado de São Paulo, a espécie deve acompanhar a distribuição geográfica de seu hospedeiro, naturalmente encontrado em Florestas ombrófilas densas, nas formações de terras baixas, na submontana e na floresta estacional semidecídua (Klein, 1979/1980; Roderjan & Kuniyoshi, 1998).

No entanto, recentemente, a distribuição da espécie foi ampliada por Drechsler-Santos *et al.* (2010) ao registrar sua ocorrência como recorrente (*host-recurrence*) em diferentes espécies nativas de *Piptadenia* na Caatinga e, por Borba-Silva (2013), ao registrar a ocorrência na Mata Atlântica do Sudeste do Brasil, no estado de Santa Catarina. Também Salvador-Montaya (2014) registrou espécimes nas florestas tropicais sazonalmente secas do noroeste do Peru, porém em hospedeiros de leguminosas distintas (*Libidibia glabrata* e *Pithecellobium excelsum*).

Morfologicamente, esses espécimes estão estreitamente relacionados ao mesmo tempo em que ocorrem em Biomas e hospedeiros distintos, sugerindo dessa forma, que o táxon possa não ser um grupo monofilético e sim, na verdade, um complexo de espécies.

A resolução de complexos taxonômicos é tão difícil como a percepção de que a especiação está em curso. A ocorrência de espécies crípticas entre os conceitos de morfoespécie está amplamente difundida nos estudos de micologia atualmente (Decock *et al.* 2007). Fischer & Binder (2004), ao tentar resolver as relações entre 69 coleções do gênero *Phellinus* ss Quel. e *Fomitiporia* Murrill (Hymenochaetaceae, Hymenochaetales), do Hemisfério Norte, ressaltaram que a aplicação unicamente de critérios morfológicos seriam de valor limitado, especialmente quando o táxon exibe ampla distribuição, tanto em termos de origem geográfica como de nicho ecológico. Usando uma abordagem integrativa (reconhecimento de espécie morfológica, filogenética e biológica) os autores detectaram doze espécies entre as sete espécies reconhecidas anteriormente pela aplicação de uma abordagem estritamente morfológica. Rajchenberg & Pildain (2012), a partir de um estudo detalhado e de comparações da podridão-parda de *Ryvardenia cretacea* Rajchenb. (Polyporaceae, Polyporales), mostraram que não haviam diferenças morfológicas significativas entre as populações da Austrália (Tasmânia, Victoria) e Argentina (Patagônia), embora a análise filogenética (nrITS) tenha revelado a existência de dois clados bem suportados. Os resultados deste estudo reforçam a ideia de que a diferenciação filogenética precede a fenotípica, o isolamento reprodutivo e, fornece mais evidências sobre a natureza complexa das questões relativas a conceitos, reconhecimento e delimitação de espécie (Urcelay *et al.* 2012).

# OBJETIVOS

## Objetivo geral

Delimitar taxonomicamente *Phellinusiptadeniae*, a partir de estudos morfológicos e moleculares, considerando dados ecológicos (distribuição geográfica e hospedeiros).

## Objetivos específicos

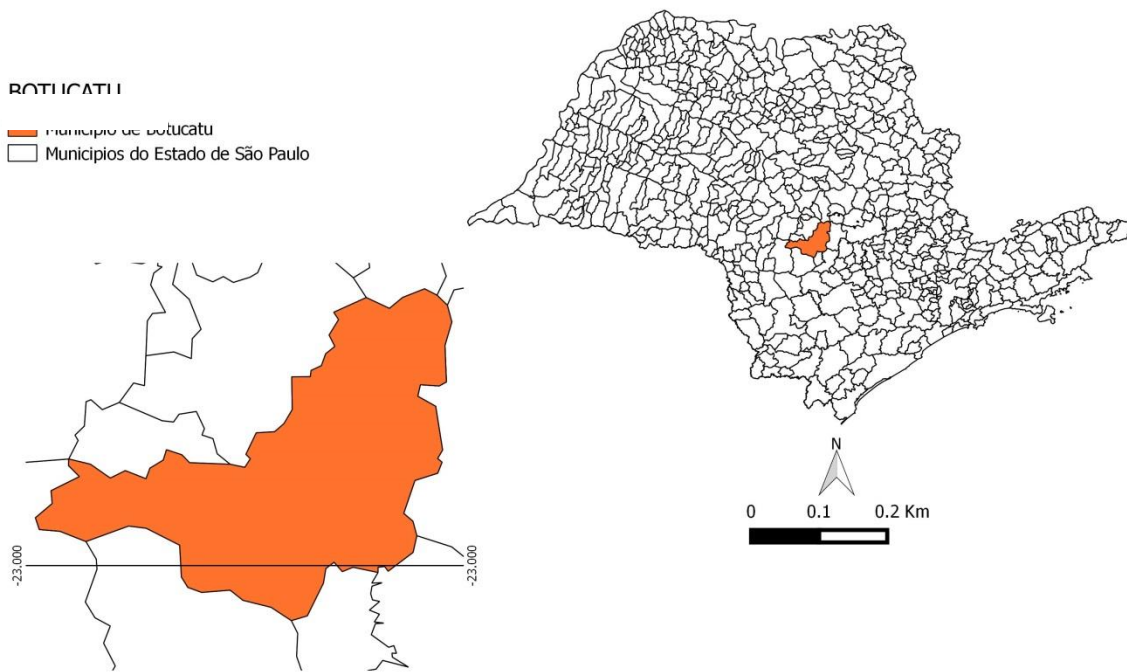
- a) Realizar coletas de espécimes de *Phellinusiptadeniae* da Mata Atlântica (Floresta estacional semidecídua) de Botucatu/SP e de Campinas/SP (localidade tipo).
- b) Realizar análises morfológicas detalhadas da macro e microscopia dos materiais coletados.
- c) Extrair DNA, amplificar e sequenciar a região ITS e LSU dos materiais coletados para incorporar a uma matriz para as análises filogenéticas;
- d) Coligir os resultados obtidos a partir das análises morfológicas e filogenéticas, levando em consideração as evidências ecológicas (distribuição geográfica e relação com hospedeiro em particular).
- e) Isolar e manter representantes do táxon na coleção de fungos do laboratório de Biologia de Fungos do departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## ÁREAS DE ESTUDO

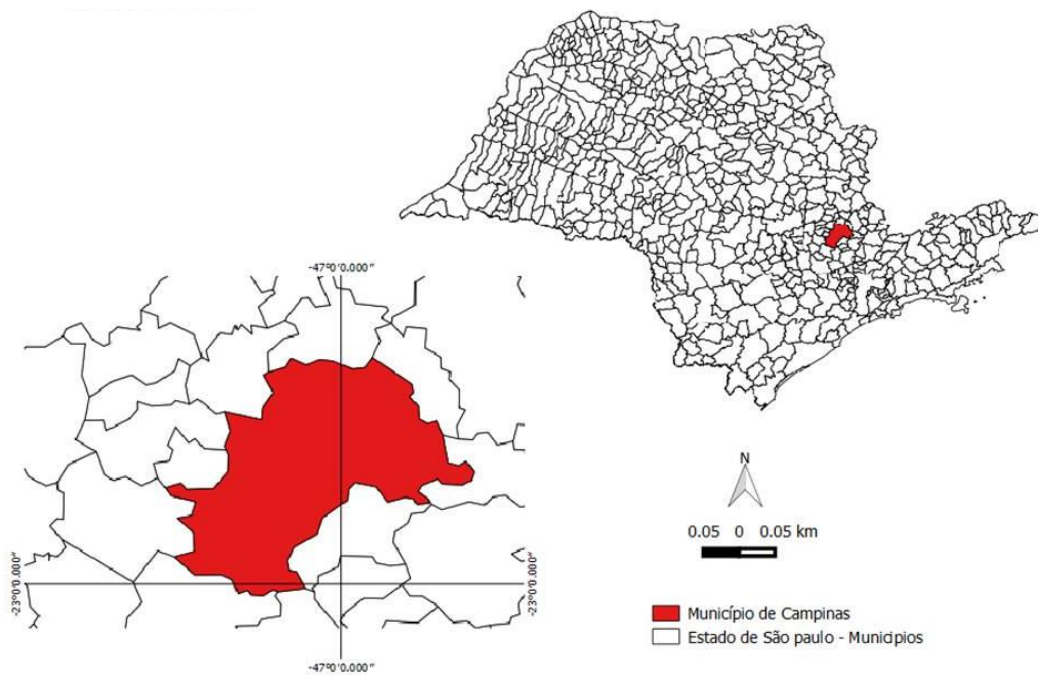
Foram realizadas expedições a campo com o intuito de coletar espécimes de *Phellinusiptadeniae* da Mata Atlântica de São Paulo. Especificamente, as coletas aconteceram em duas áreas: 1. Floresta semi decídua da fazenda experimental do Lajeado, pertencente à Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP campus de Botucatu (Figura 1a e 2a); e 2. Bosque dos Jequitibás, Instituto Agrônomo de Campinas – SP, localidade onde foi encontrado o material tipo (Figura 1b, 2b e 2c);

## Botucatu - São Paulo



(a)

## Campinas – São Paulo



(b)

Figura 1: Mapas dos Municípios de Botucatu e Campinas. a) Localização do município de Botucatu no Estado de São Paulo; b) Localização do município de Campinas no Estado de São Paulo;



(a)



(b)



(c)

Figura 2: Áreas de coleta. a) Vista aérea da Fazenda Lajeado (Google Earth) – Botucatu – detalhe para o mapa a área de coleta (Trilha Ecológica Casa da Natureza). b) Bosque dos Jequitibás – Campinas – Vista aérea do bosque – fonte Google; c) Visita ao Bosque para expedição de Campo.

#### PROCEDIMENTO DE CAMPO:

Para Botucatu, as expedições ocorreram mensalmente no primeiro semestre da previsão para a execução do trabalho, totalizando um esforço de coleta de seis meses. Já para Campinas, uma única coleta foi realizada no mês de julho de 2014.

Com o auxílio de material cortante foram coletados basidiomas inteiros. Antes de serem armazenados em sacos de papel, foram retirados pequenos fragmentos de porções mais internas (contexto e tubos), entre dois e três centímetros, com bisturi estéril, e acondicionados em micro tubos contendo sílica para desidratação para, posteriormente, acontecer os procedimentos de técnicas moleculares. Os microtubos foram devidamente identificados, juntamente com os basidiomas coletados e guardados em caixa de isopor até a chegada ao laboratório para imediato processamento. As amostras que não foram utilizadas foram armazenadas em *freezer* -80°C.

Durante as coletas foram registradas informações sobre a ocorrência de basidiomas em substratos mortos ou vivos e, quando possível, a identificação do substrato. O trabalho de campo foi amparado pela documentação fotográfica tanto dos basidiomas, auxiliado de escala métrica, como do substrato.

#### PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS:

##### **- Desidratação e incorporação a coleções micológicas**

Após a coleta, os espécimes foram armazenados em sacos de papel, individualmente, e levados para o laboratório. As amostras foram mantidas de 12 a 24 horas em estufa entre 40 e 50°C para desidratação (Drechsler-Santos, 2010).

Os materiais coletados foram depositados no Herbário Maria Eneyda P. K. Fidalgo, do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo, com

duplicadas encaminhadas para o herbário-FLOR, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Para o trabalho, foi desenvolvida uma ficha de coleta que foi preenchida durante a expedição de campo e as análises realizadas no laboratório, que contemplam dados como número de coleta, data, nome do coletor, dados do espécime (família, gênero, espécie), local e localidade específica da coleta.

### **- Análise morfológica**

Macro morfologia: dos basidiomas coletados, ainda em campo, foram realizadas medidas da largura (do substrato a margem), comprimento (distância paralela ao substrato), espessura (distâncias entre as superfícies do basidioma na porção mais próxima da inserção no tronco) e registrados as variações e valores extremos dessas medidas. Em laboratório, a olho nu ou com auxílio de estéreo microscópio ZEISS Stereo Discovery V20 com foto documentador, foram observados e registrados dados como cor e consistência do basidioma; do píleo, formato e presença ou ausência de estipe; da superfície abhimenial, margem e cor; da superfície himenial, tipo, forma dos poros, número de poros por mm, bem como do contexto e tubos foram observados e anotados dados de cor, aspecto, espessura, estratificação, presença de linhas negras (Drechsler-Santos, 2010; Torres-Torres & Dávalos, 2012).

Micro morfologia: para observação microscópica do material foram realizados cortes histológicos a mão livre, com lâmina de aço inoxidável, de regiões do contexto e tubos, e das superfícies abhimenial e himenial dos basidiomas. Os cortes foram colocados entre lâminas e lamínulas, com reagente de Melzer, utilizado para detectar a presença de polissacarídeos integrantes de paredes hifais, basidiósporos e outras microestruturas (Baral, 1987); floxina 1% (corante citoplasmático) e KOH a 5% (hidratante) para observação de basídios e tipos hifais (Drechsler, 2010; Torres-Torres & Dávalos, 2012). A análise foi realizada em microscópio *Zeiss Primo Star* e Olympus BX60 com câmera digital DP72 (com foto documentador) nas objetivas de 20, 40 e 100 vezes, sendo nessa última com uso de óleo de imersão próprio. As lâminas montadas dessa forma permitiram a observação

do sistema hifal, de elementos estéreis, de basídios e de basidiósporos (Ryvarden, 1991).

Para identificação foi utilizada bibliografia própria, como Ryvarden (2004). As descrições basearam-se em literatura e feitas de acordo com a análise do material coletado.

#### **- Ilustrações e fotografias**

As fotografias em nível macroscópico foram obtidas com câmera digital CANON Powershot Sx160is e estéreo microscópio ZEISS Stereo Discovery V20. As fotografias em nível microscópico foram obtidas com microscópio OLYMPUS BX60 e câmera digital DP72.

#### **- Isolamento**

A partir dos basidiomas coletados houve a tentativa de obtenção de culturas puras com o objetivo de incorporá-las à coleção do Laboratório Biologia de Fungos, do departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu. Para tal, foram utilizados pequenos fragmentos do basidioma, de maneira asséptica, realizada em câmara de fluxo laminar, com auxílio de uma lâmina de aço inoxidável e pinça estéril, que foram inoculados em placas de *petri* contento meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) acrescido de antibiótico. As tentativas de isolamento aconteceram com todos os fungos coletados. Cada basidioma foi repicado em quatro placas, *a priori*, e em seguida, com o transcorrer dos dias, eram repicados quantas vezes fossem necessárias.

Cada placa foi devidamente identificada e em seguida foram acondicionadas em estufa incubadora BOD a 27°C. Os cultivos foram acompanhados diariamente para controlar possíveis contaminações e o material inoculado foi novamente repicado em uma nova placa.

#### **- Extração de DNA, amplificação e sequenciamento dos marcadores moleculares e análises filogenéticas**

Para as extrações de DNA total dos basidiomas foram seguidos os protocolos de Doyle & Doyle (1987), modificado por Goes-Neto (2005) e Gräser

*et al.* (1999), cujas etapas, para ambos envolvem maceração do tecido fúngico em N<sub>2</sub> líquido, sendo o tampão de extração usado a base de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) e EDTA.

Os extratos foram submetidas à técnica de PCR em que foram empregados os pares de *primers* ITS4/ITS5 (White *et al.*, 1990) e LSU LR0R e LR5 conservados para a região de rDNA, para amplificação respectivamente das região (ribossomais) espaçadora interna transcrita (*Internal transcribed spacer*) e subunidade maior (*large subunit*). A amplificação foi realizada em termociclador aplicando-se a seguinte ciclagem: i) desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos; ii) 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos e iii) extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a realização das amplificações, foi realizada eletroforese em gel de agarose (USB) 1,5%, em tampão TBE 1x (Tris-Ácido Bórico-EDTA), por aproximadamente 1h 30min a 80V, utilizando-se o corante *Blue Orange Loading Dye* (Promega®), e visualização dos *amplicons* em transiluminador com sistema de captura de imagens (*SynGene*®). Confirmada a amplificação das regiões alvo, foi realizada a purificação desses *amplicons* com enzima *exosap-it* (USB®) realizado em termociclador aplicando-se a seguinte ciclagem: i) 15 minutos a 37°C e ii) 15 minutos a 80°C. Após purificação as amostras foram enviadas para sequenciamento, o qual foi realizado pelo sistema *BigDye*® *Terminator* v3.1, *Cycle Sequencing*® Kit em sequenciador automático ABI3500® (*Applied Biosystems*®) no Laboratório de Diagnóstico Molecular, do departamento de Microbiologia e Imunologia da UNESP campus de Botucatu.

Os cromatogramas de sequenciamento obtidos foram comparados visualmente e as sequências alinhadas com o auxílio dos softwares BioEdit (*Bio Edit Sequence Alignment Editor*) e Mega 6.0, de forma a obter as sequências consensos entre as duas fitas de cada isolado. As sequências consensos obtidas foram então comparadas pela ferramenta *Blastn* junto à base de dados do NCBI, de forma a obter os alinhamentos com sequências depositadas que apresentassem as maiores porcentagens de identidade.

Procedeu-se também uma análise filogenética das sequências obtidas, por *Neighbor Joining* e Máxima verossimilhança, com 1000 réplicas de *bootstrap*, tanto para as sequências da região ITS como LSU, além de uma análise concatenada (Bayesiana) dessas duas regiões. Para a construção dos

alinhamentos a partir das matrizes consenso, utilizou-se o software *Geneious*. As árvores foram geradas usando as ferramentas *on line* do site *Cipres Phylogeny* (<http://www.phylo.org/>). O Modelo evolutivo usado foi Kimura-2, calculado pelo próprio site.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 25 espécimes, todos confirmados morfológicamente como pertencentes ao complexo *Phellinus piptadeniae*. Todos os espécimes coletados foram encontrados em *Piptadenia gonoachanta* e os dados de campo, hospedeiros vivos/mortos pode ser observado na Tabela 1.

TABELA 1: Dados de campo das coletas e coordenadas geográficas dos espécimes coletados.

Nº DE COLETOR	SUBSTRATO	ÁREA DE COLETA	COORDENADAS GEOGRAFICAS
<b>MF 007</b>	Árvore morta <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22 ° 50' 16.9 "S 048° 25' 31.7"W
<b>MF 008</b>	Árvore viva <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22 ° 50' 16.8 "S 048° 25' 34.5"W
<b>MF 026</b>	Árvore morta <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 14,7"S 048° 25' 30,5"W
<b>MF 027</b>	Árvore viva <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 15,1"S 048° 25' 35,4"W
<b>MF 029</b>	Árvore morta <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	Coordenada não determinada
<b>MF 031</b>	Árvore viva <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 13,3" S 048° 25' 31,8"W
<b>MF 032</b>	Árvore morta <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 13,6"S 048° 25' 39,7"W

<b>MF 034</b>	Árvore viva <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 14,8"S 048° 25' 44,5"W
<b>MF 035</b>	Árvore viva <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 13,1"S 048° 25' 45,5"W
<b>MF 036</b>	árvore viva <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 11,1"S 048° 25' 47,6"W
<b>MF 037</b>	árvore morta <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 13"S 048° 25' 48,2"W
<b>MF 038</b>	árvore viva <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 13,3" S 048° 25' 31,8"W
<b>MF 039</b>	árvore morta <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 15,2"S 048° 25' 33,8"W
<b>MF 040</b>	árvore viva <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	Coordenada não determinada
<b>MF 041</b>	árvore morta <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 14,8"S 048° 25' 30,1"W
<b>MF 042</b>	árvore morta <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 13,4"S 048° 25' 48"W
<b>MF 043</b>	árvore viva <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 11,1"S 048° 25' 47,6"W
<b>MF 044</b>	árvore morta <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 13,4"S 048° 25' 29,6"W
<b>MF 046</b>	árvore morta <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 15,1"S 048° 25' 35,8"W
<b>MF 047</b>	árvore morta <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 14,7"S 048° 25' 36,6"W
<b>MF 048</b>	árvore viva <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 14,5"S 048° 25' 44,7"W
<b>MF 049</b>	árvore morta	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 13,2"S 048° 25' 45,0"W

	<i>Piptadenia gonoacantha</i>		
<b>MF 050</b>	árvore morta <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 12,6"S 048° 25' 46,8"W
<b>MF 051</b>	árvore viva <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Trilha Ecológica Casa da Natureza – Fazenda Lajeado – UNESP Botucatu/sp	22° 50' 13,2"S 048° 25' 47,4"W
<b>MF 052</b>	árvore viva <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Bosque dos Jequitibás – Campina/SP	22° 54' 29,7"S 047° 02' 59,5"W

De acordo com o trabalho de Teixeira, 1950, *Phellinusiptadeniae* deveria crescer exclusivamente em *Piptadenia gonoacantha* (pau jacaré), acompanhando a distribuição desse hospedeiro na mata Atlântica. Os espécimes aqui coletados vão ao encontro do sugerido por Teixeira, vivendo sobre essa respectiva espécie botânica, no referido bioma. Porém, espécimes de *Phellinusiptadeniae* estudados na Caatinga (Drechsler-Santos *et al.* 2010) foram registrados em diferentes hospedeiros (ainda que leguminosas, embora havendo uma gama de outros grupos vegetais como potenciais hospedeiros) e, ainda, em trabalho realizado nas florestas secas no norte do Peru, espécimes de *Phellinusiptadeniae* foram coletados associado a diferentes gêneros de leguminosas (Salvador-Montoya, 2014). Ou seja: o organismo não acompanha exclusivamente a distribuição de um único hospedeiro, todavia, as leguminosas tem uma importância como nicho ecológico na história evolutiva dessa espécie do fungo.

Informações relevantes sobre os aspectos morfológicos foram reunidos na Tabela 2.

TABELA 2: Dados macro e micro morfológicos dos basidiomas coletados.

Espécimes	Basidioma		Contexto Linha negra	Sup. Himenial	Basidiósporos	
				Poros/mm	Tamanho ( $\mu$ m)	Forma
MF 007	SB	A	Distinta	3-4	5.0x3.5	ME
MF 008	SB	A	Distinta	4-5	5.0x3.5	E
MF 026	SB	A	Distinta	4-5 (-6)	4.9x3.8	ME
MF 027	SB	AU	Distinta	4-5	5.0x4.1	ME
MF 029	P	T	Distinta	(3-) 4-5	4.8x3.6	ME
MF 031	SB	A	Distinta	4-5 (-6)	5.2x3.7	E
MF 032	SB	AU	Distinta	3-4	5.0x4.1	ME
MF 034	SB	AU	Distinta	(3-) 4-5 (-6)	5.3x3.7	E
MF 035	SB	AU	Distinta	4-5	5.2x3.6	E
MF 036	SB	AU	Distinta	4-5 (-6)	4.9x3.5	E
MF 037	p	U	Distinta	(3-) 4-5 (-6)	4.8x3.7	ME
MF 038	SB	AU	Distinta	(3-) 4-5 (-6)	5.0x3.5	ME
MF 039	SB	T	Distinta	4-5 (-6)	5.1x4.2	E
MF 040	SB	AU	Distinta	(3-) 4-5	4.8x3.6	ME
MF 041	SB	A	Distinta	4-5	4.8x3.7	ME
MF 042	SB	AU	Distinta	4-5 (-6)	5.2x4.1	ME
MF 043	P	AU	Distinta	4-5	4.9x3.5	ME
MF 044	SB	AU	Distinta	(3-) 4-5	5.0x 3.6	ME
MF 046	SB	AU	Distinta	3-4	4.7x3.5	ME
MF 047	P	AU	Distinta	4-5	4.9x3.6	ME
MF 048	P	U	Distinta	4-5 (-6)	5.1x3.9	ME
MF 049	SB	AU	Distinta	4-5 (-6)	5.0x3.8	ME
MF 050	P	U	Distinta	4-5	4.8x3.6	ME
MF 051	SB	AU	Distinta	(3-) 4-5	5.2x3.7	E
MF 052	SB	AU	Distinta	4-5	5.0x4.1	ME

SB: Sazonal/Bi-sazonal P: Perene A: Aplanado AU: Aplanado/Ungulado U: Ungulado T:Tríquetro  
E:Elipsóide ME: Maioria Elipsóide

A partir do estudo da morfologia dos materiais foi possível observar que os morfotipos dos basidiomas mais encontrados foram os aplanados e unguilados, havendo apenas dois registros para o tipo tríquetro. O sistema hifal é dimítico, com hifas esqueléticas e generativas, sendo essas últimas presentes sozinhas no contexto; em outras palavras, as hifas esqueléticas estavam presentes apenas na trama dos tubos. Grande parte dos basidiósporos observados possui formato elipsoide, embora alguns fossem arredondados. A linha negra no contexto é notória (Figuras 3 a 9).



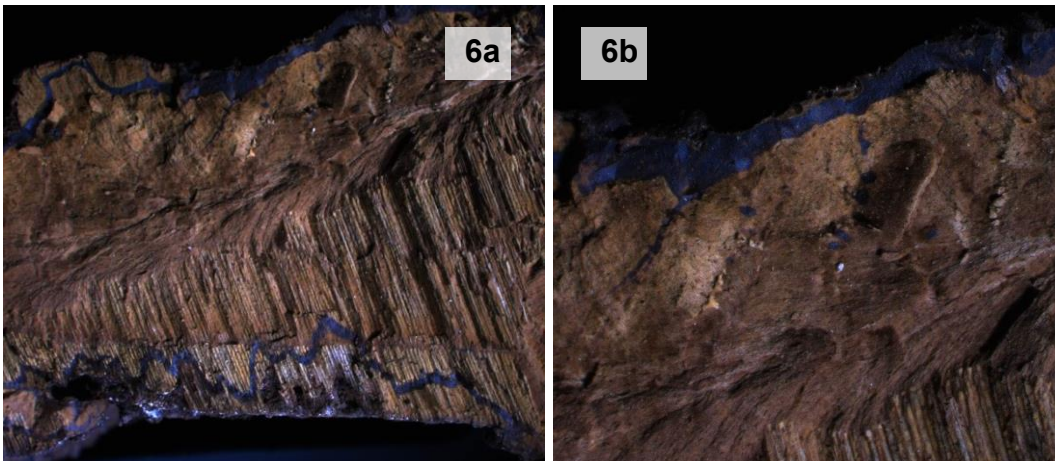
Figura 3: (a) (b) e (c) Basidiomas em campo sob seu hospedeiro, pau jacaré.



Figura 4: Basidiomas em laboratório, após desidratação.



Figura 5: Parte interna do basidioma – Tubos, contexto e linha negra.



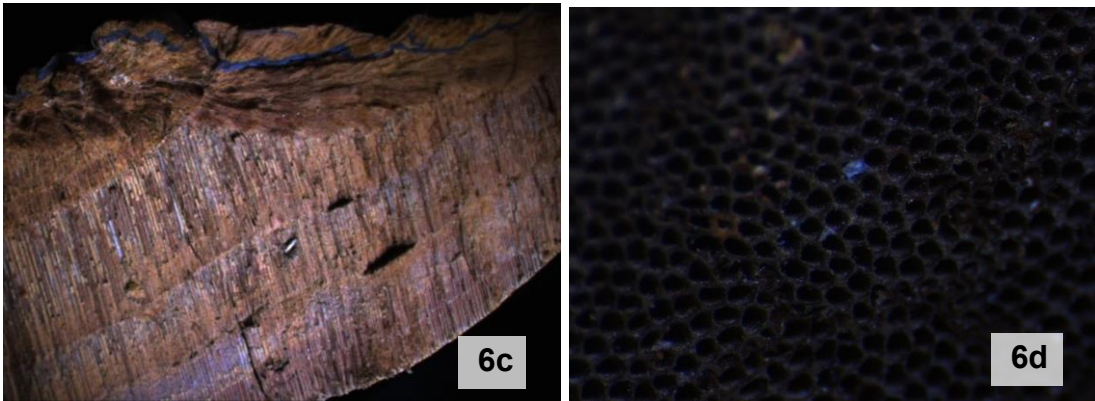


Figura 6: (a) Parte interna do basidioma – Detalhe aproximado da porção do contexto e tubos; (b) Detalhe aproximado da linha negra no contexto; (c) Detalhe dos tubos; e (d) superfície himenial.

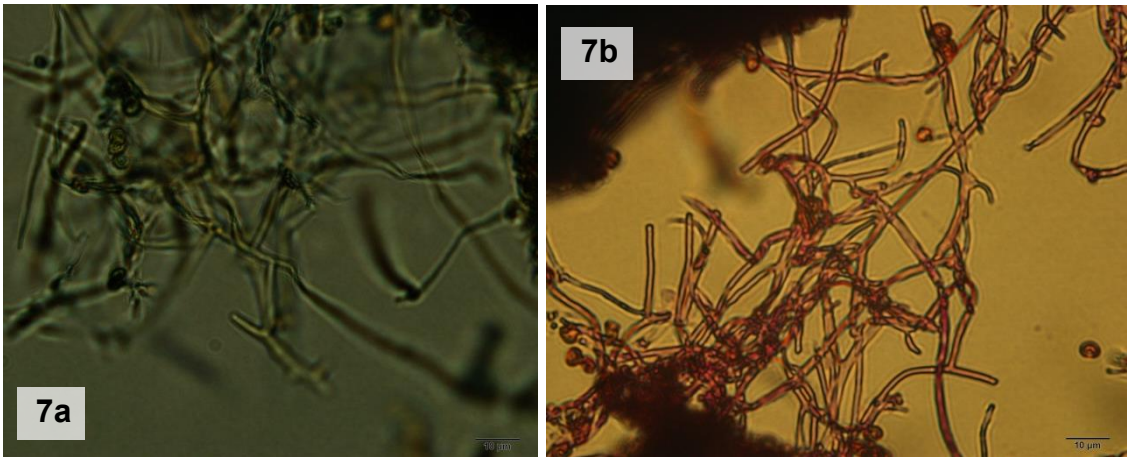
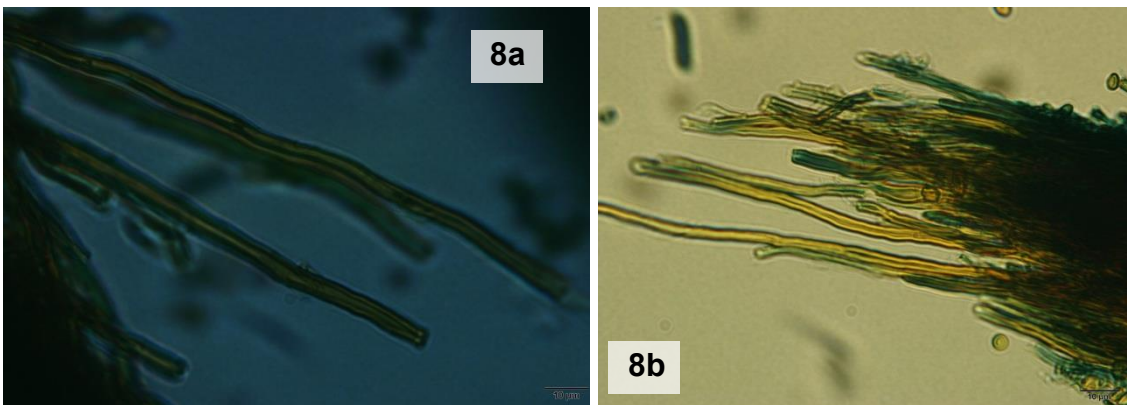


Figura 7: (a) e (b) Sistema Hifal – hifas esqueléticas.



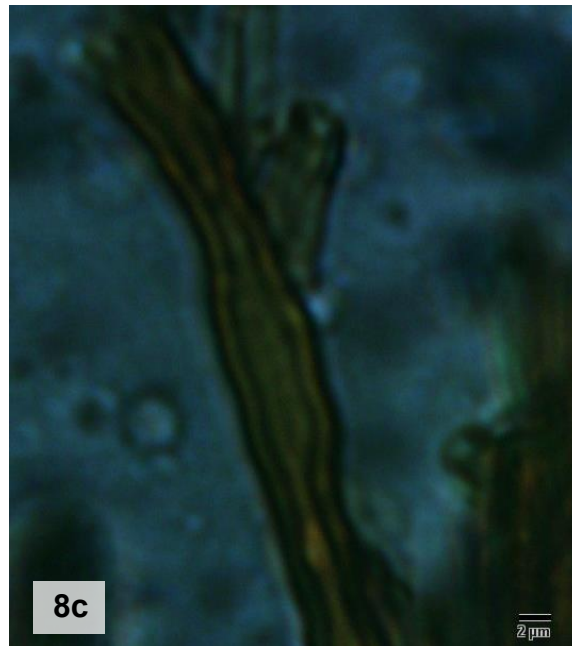


Figura 8: (a), (b) Sistema Hifal – hifas generativas; e (c) hifas generativas detalhe espessamento de parede.

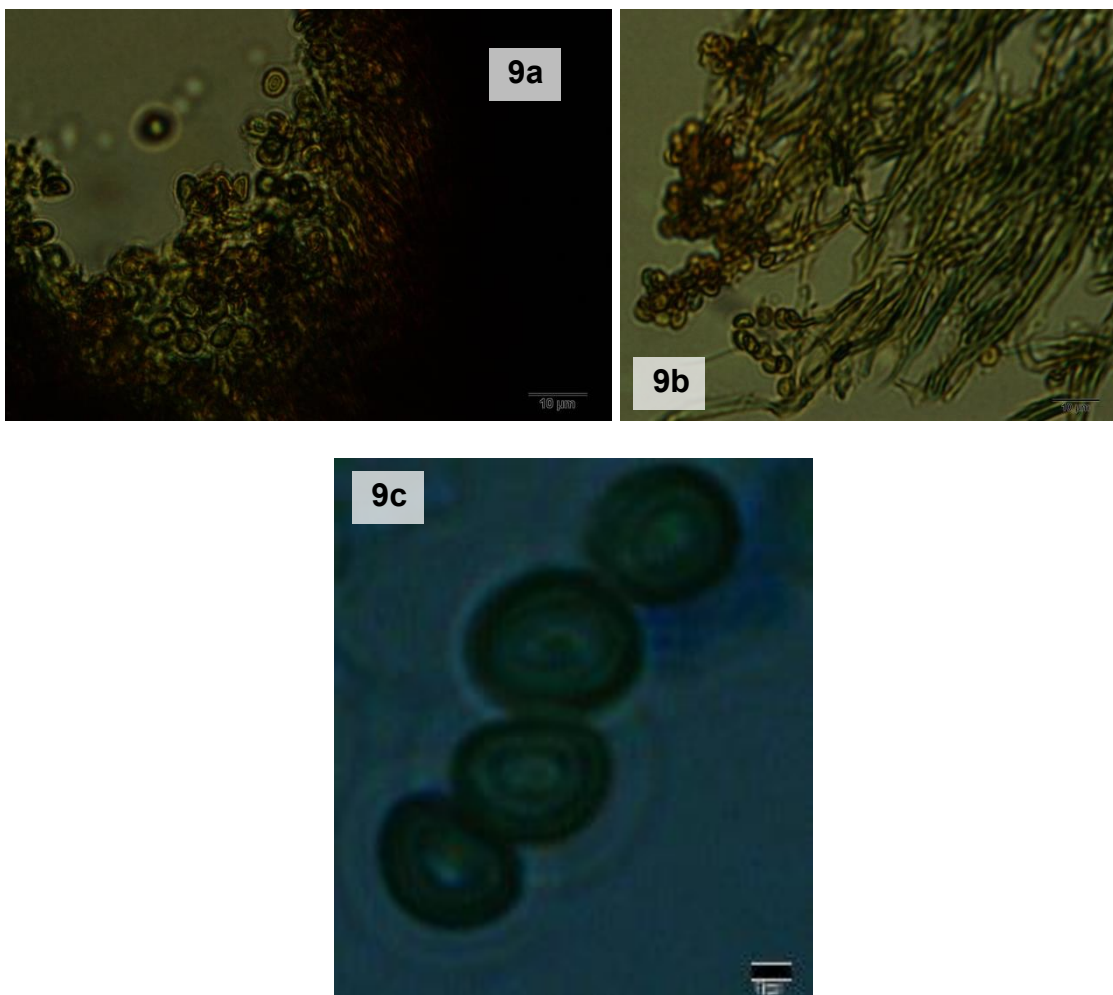


Figura 9: (a), (b) Basidiósporos; e (c) Basidiósporos – detalhe da parede.

## ISOLAMENTO

Do material inoculado diretamente dos basidiomas houve contaminação dos inóculos em grande parte das placas dos isolados. Mesmo com o local de trabalho sendo asséptico, incluindo o fato de que o isolamento foi feito em câmara de fluxo laminar, a contaminação oriunda do material ambiental não conseguiu ser vencida em sua totalidade. De todos os organismos coletados foi possível o Isolamento de parte deles, cujo material isolado completa a micoteca do laboratório de biologia de Fungos, da UNESP, campus de Botucatu (Figura 10). Os micélios isolados são dos materiais MF031, MF035, MF036, MF039, MF042, MF045.

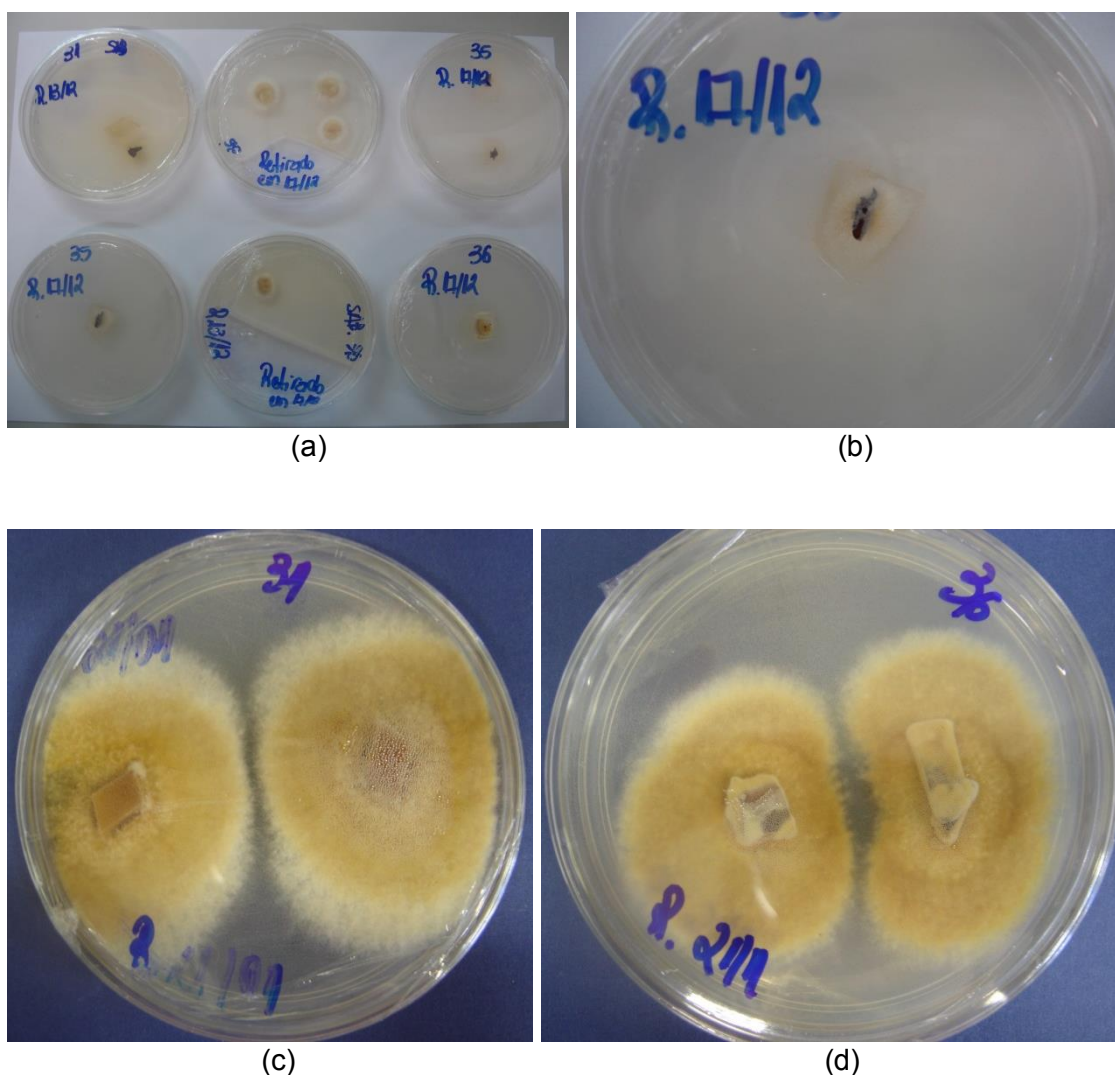


Figura 10: (a) Placas com início de desenvolvimento micelial de parte das amostras dos inóculos usados nas tentativas de isolamento; (b) micélio crescente em fragmento repicado para nova placa; (c) Placas com micélio bem desenvolvido.

Todos os materiais coletados tiveram seu DNA extraído. As amplificações foram bem sucedidas (Figura 11), mas não para todos os espécimes, seja para a região ITS, LSU, ou ambas (Tabela 3). Embora inúmeras tentativas fossem feitas, incluindo a realização de *double* PCR, aumento de volume no mix da PCR e alteração do protocolo de extração de DNA, alguns materiais não tiveram resultado positivo, ora porque as bandas não saíram dos poços, ora porque as bandas estão tão fracas que não era possível recolher concentração mínima para envio para sequenciamento, ou ainda, sequer apareciam bandas (Figura 12). Também é possível visualizar arrastes bem marcados sugerindo degradação do material genético (Figura 12).

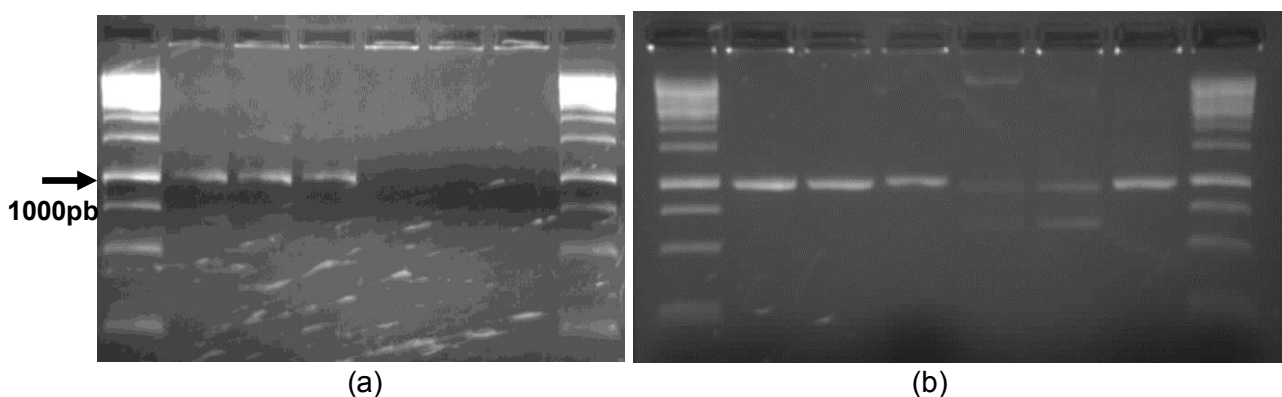


Figura 11 : (a) e (b) Gel de agarose 1.5% com parte das amostras amplificadas para região LSU. Bandas com aproximadamente 1000pb.

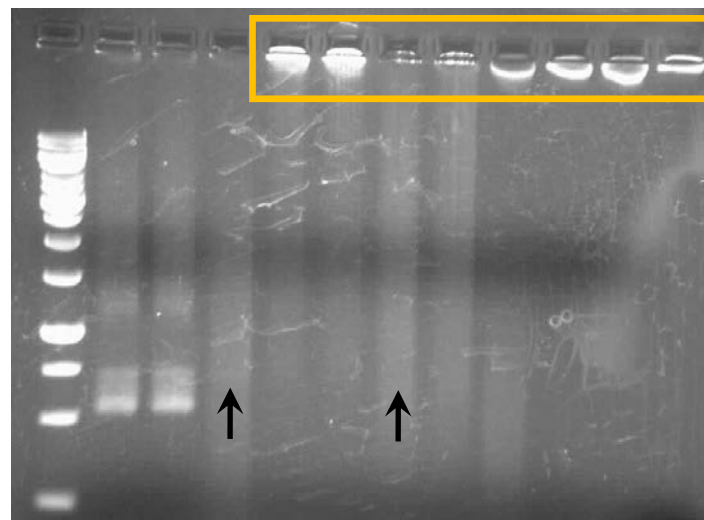


Figura 12: Gel de agarose 1.5% com parte das amostras amplificadas para região ITS. Detalhe para bandas que não saíram dos poços durante a corrida. Presença de arrastes.

Não há registros de depósitos da espécie *Phellinusiptadeniae* no Genbank. Porém, quando comparados com essa base de dados os *amplicons* tinham identidade com espécies do mesmo gênero.

TABELA 3: Dados de identificações moleculares de *Phellinusiptadeniae*, com número de coletor, identificação molecular das regiões estudadas e respectivos acessos Genbank.

Número de coletor	Identificação Molecular		Acesso Genbank	
	ITS	LSU	ITS	LSU
<b>MF 007</b>	X	X	KP412288	KP412268
<b>MF 008</b>	X	X	KP412289	KP412269
<b>MF 026</b>	X	X	KP412290	KP412270
<b>MF 027</b>	X	X	KP412291	KP412271
<b>MF 029</b>	X	X	KP412292	KP412272
<b>MF 031</b>	X	X	KP412293	KP412273
<b>MF 032</b>	X	X	KP412294	KP412275
<b>MF 034</b>	X	X	KP412295	KP412276
<b>MF 035</b>	X		KP412296	
<b>MF 036</b>	X	X	KP412297	KP412277
<b>MF 037</b>	X		KP4122898	

<b>MF 038</b>	X	X	KP412299	KP412278
<b>MF 039</b>	X	X	KP412300	KP412279
<b>MF 040</b>	X	X	KP412301	KP412280
<b>MF 041</b>	X		KP412302	
<b>MF 042</b>	X		KP412303	
<b>MF 043</b>	X	X	KP412304	KP412281
<b>MF 044</b>	X	X	KP412305	KP412282
<b>MF 046</b>	X	X	KP412306	KP412283
<b>MF 047</b>				
<b>MF 048</b>		X		KP412284
<b>MF 049</b>	X	X	KP412307	KP412285
<b>MF 050</b>	X	X	KP412308	KP412286
<b>MF 051</b>				
<b>MF 052</b>	X	X	KP412309	P412287

Três árvores filogenéticas para cada gene estudado (Figuras 13 a 18) foram construídas a partir das matrizes alinhadas no software *Geneious*. As

matrizes possuíam muitos *gaps* e mutações de modo que regiões com grandes inserções foram retiradas para diminuir o ruído durante a análise. As árvores foram geradas usando as ferramentas *on line* do site *Cipres Phylogeny* (<http://www.phylo.org/>) com teste de *bootstrap* com 1000 réplicas, cujos valores nos ramos mais significativos foram destacados. Em todas as construções foram usados como grupos externos espécies próximas estudadas por Zhou em trabalho publicado em 2014.

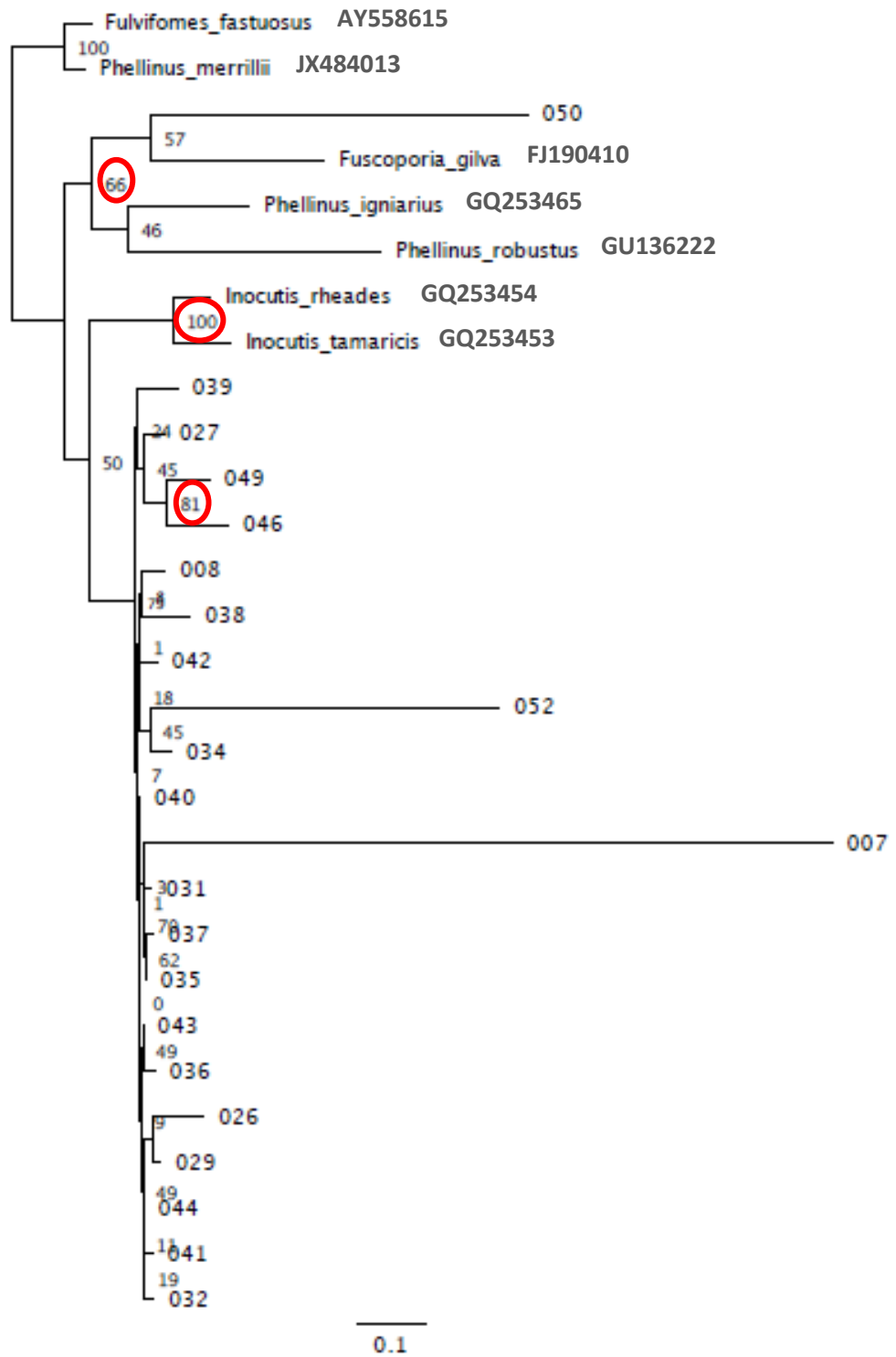


Figura 13: Árvore filogenética (máxima verossimilhança) com as espécimes de *Phellinus piptadeniae* da região de Botucatu e Campinas, obtida pela análise de sequência de ITS rDNA.

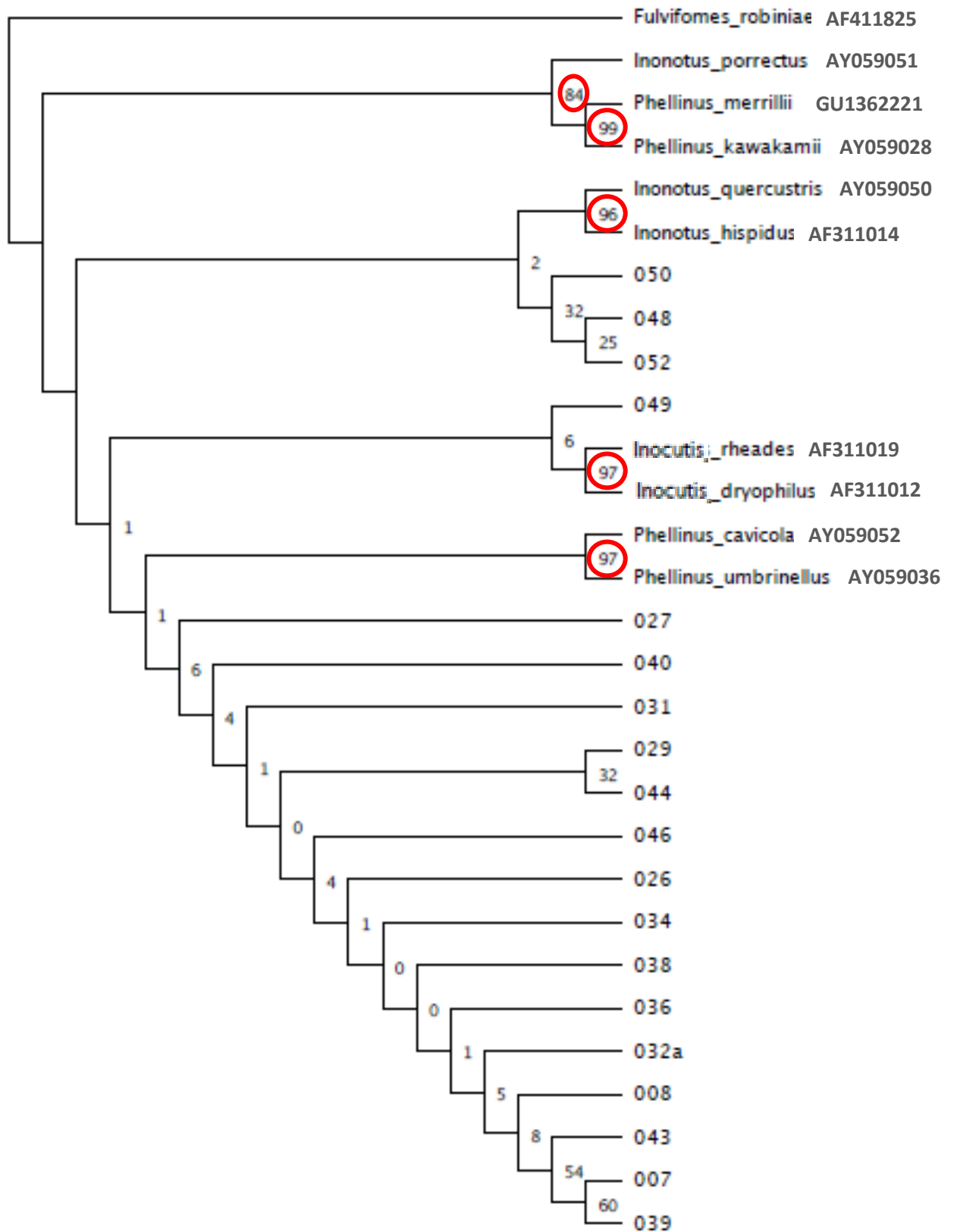


Figura 14: Árvore filogenética (máxima verossimilhança) com as espécimes de *Phellinus piptadeniae* da região de Botucatu e Campinas, obtida pela análise de sequência de LSU rDNA.

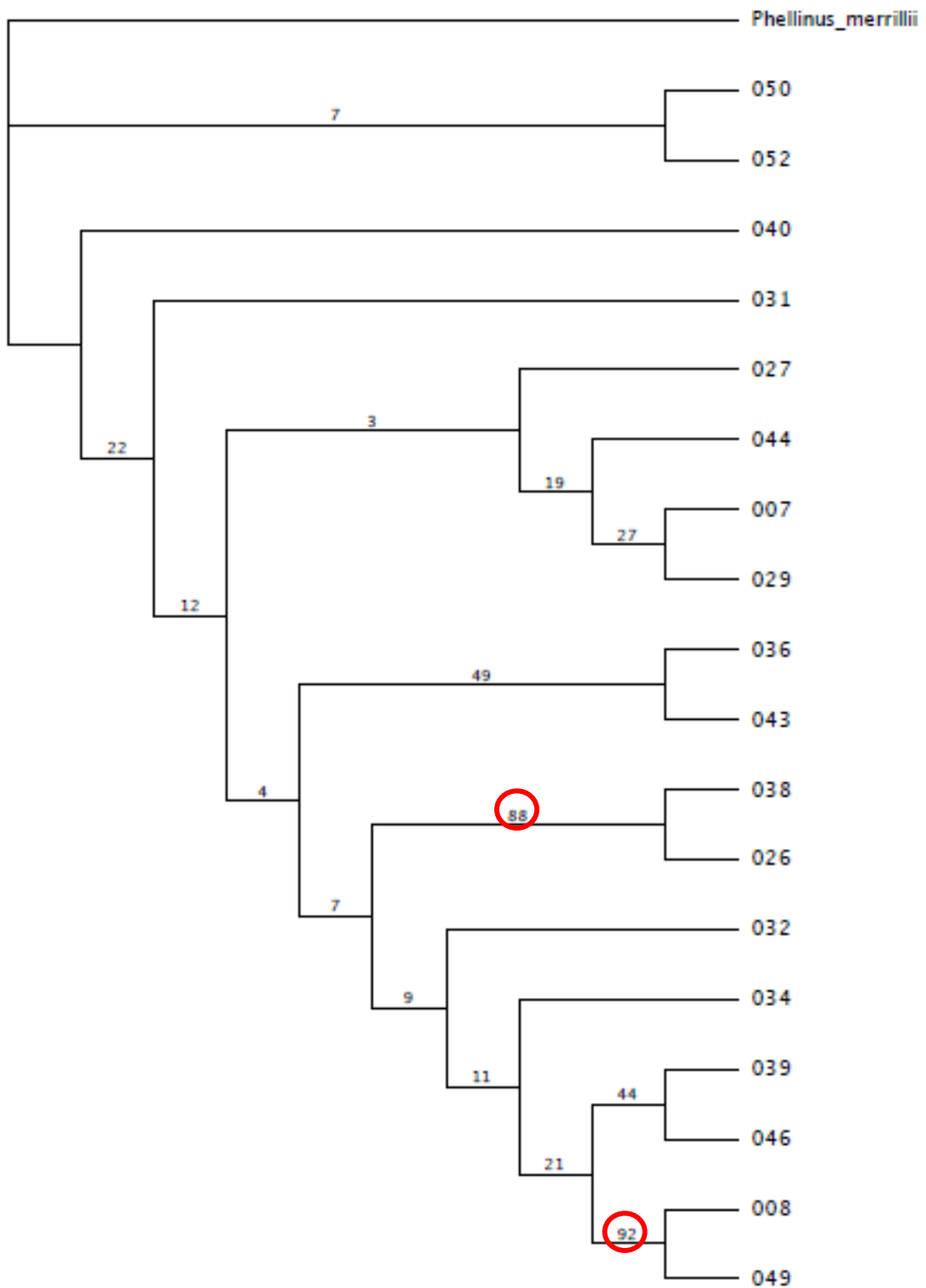


Figura 15: Árvore filogenética (máxima verossimilhança) com as espécimes de *Phellinus pipitadeniae* da região de Botucatu e Campinas, obtida pela análise de sequência de LSU e ITS rDNA concatenadas.

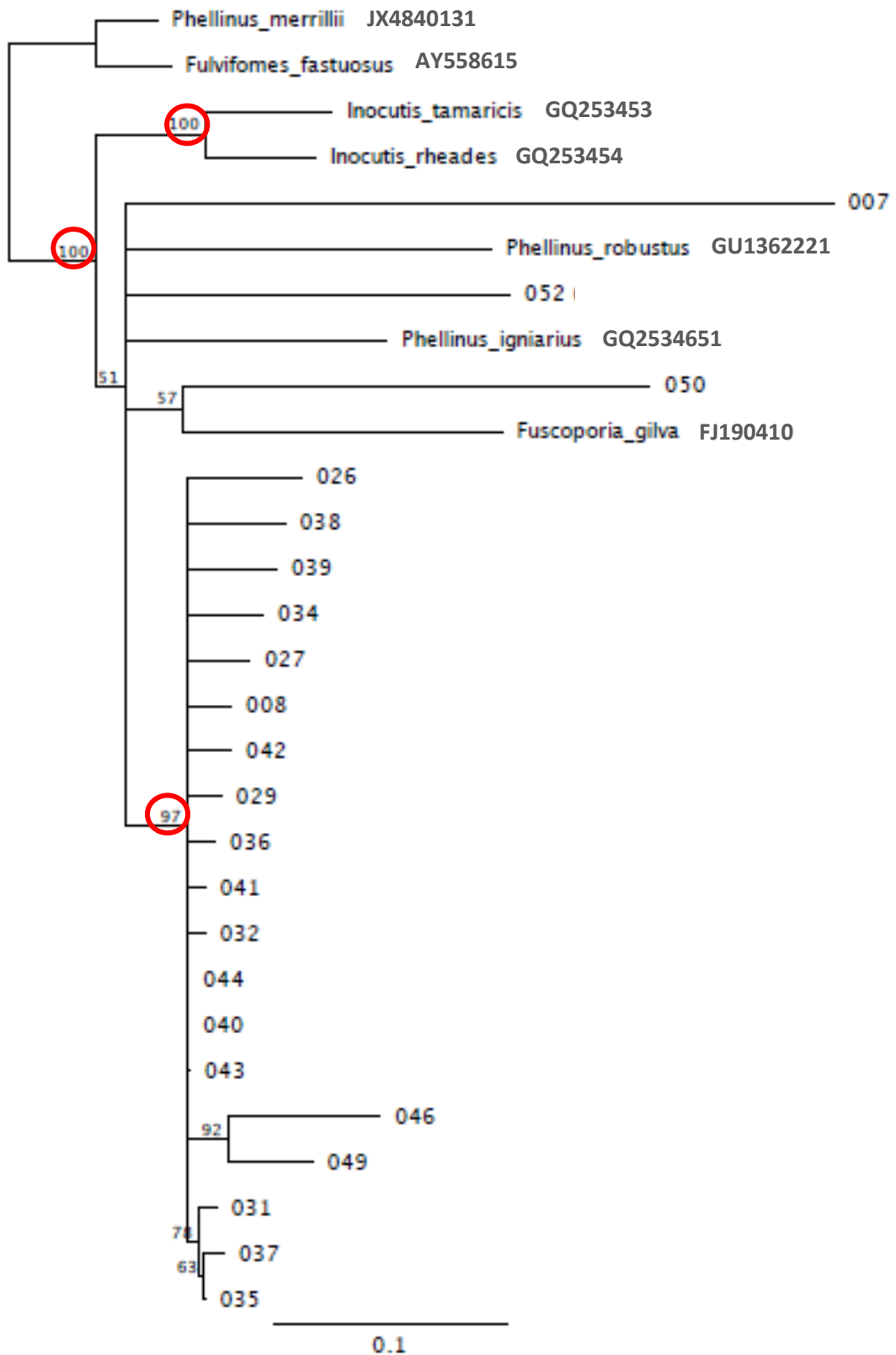


Figura 16: Árvore filogenética (*Neighbor Joining*) com as espécimes de *Phellinus piptadeniae* da região de Botucatu e Campinas, obtida pela análise de sequência de ITS rDNA.

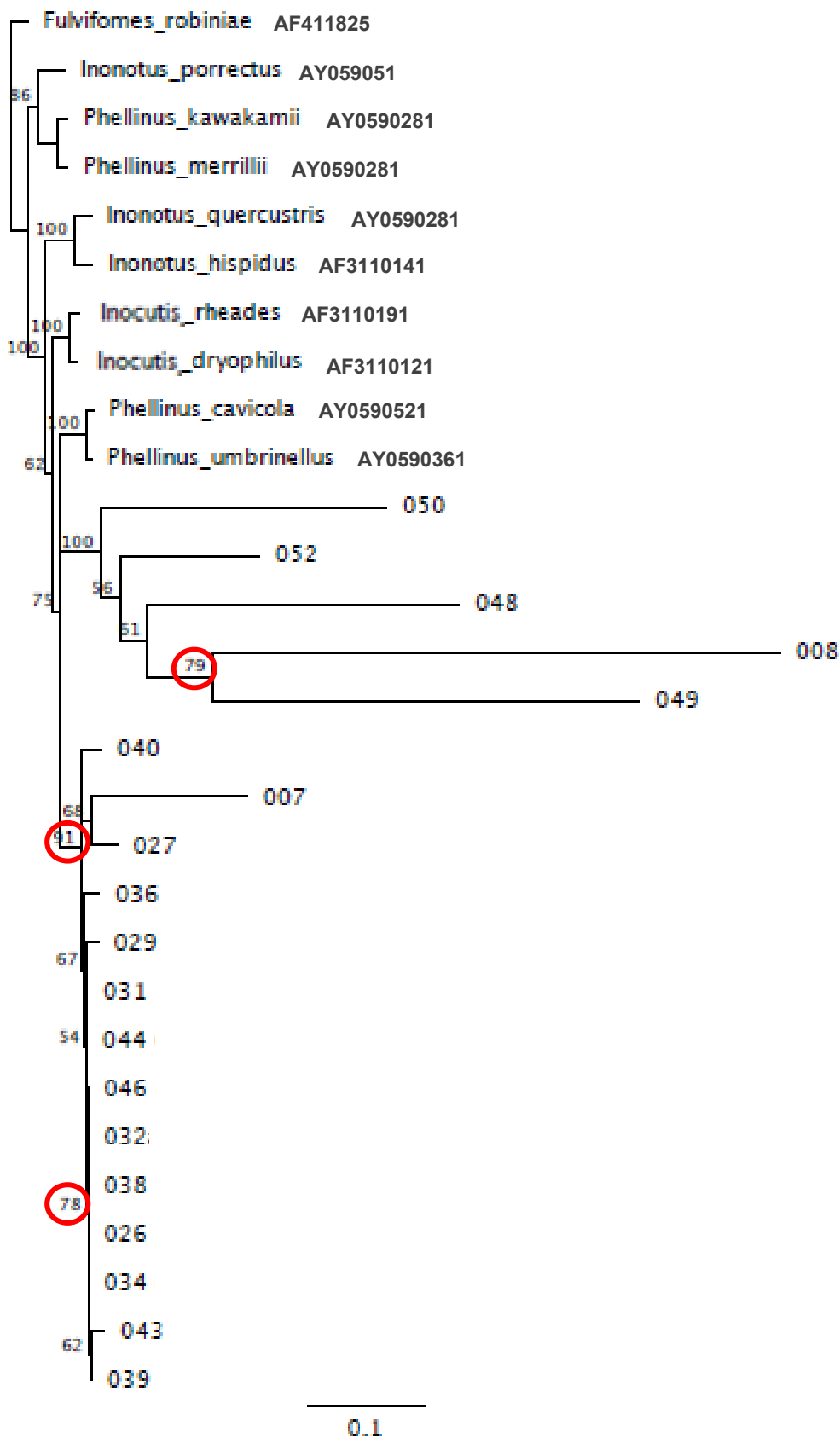


Figura 17: Árvore filogenética (*Neighbor Joining*) com as espécimes de *Phellinus piptadeniae* da região de Botucatu e Campinas, obtida pela análise de sequência de LSU rDNA.

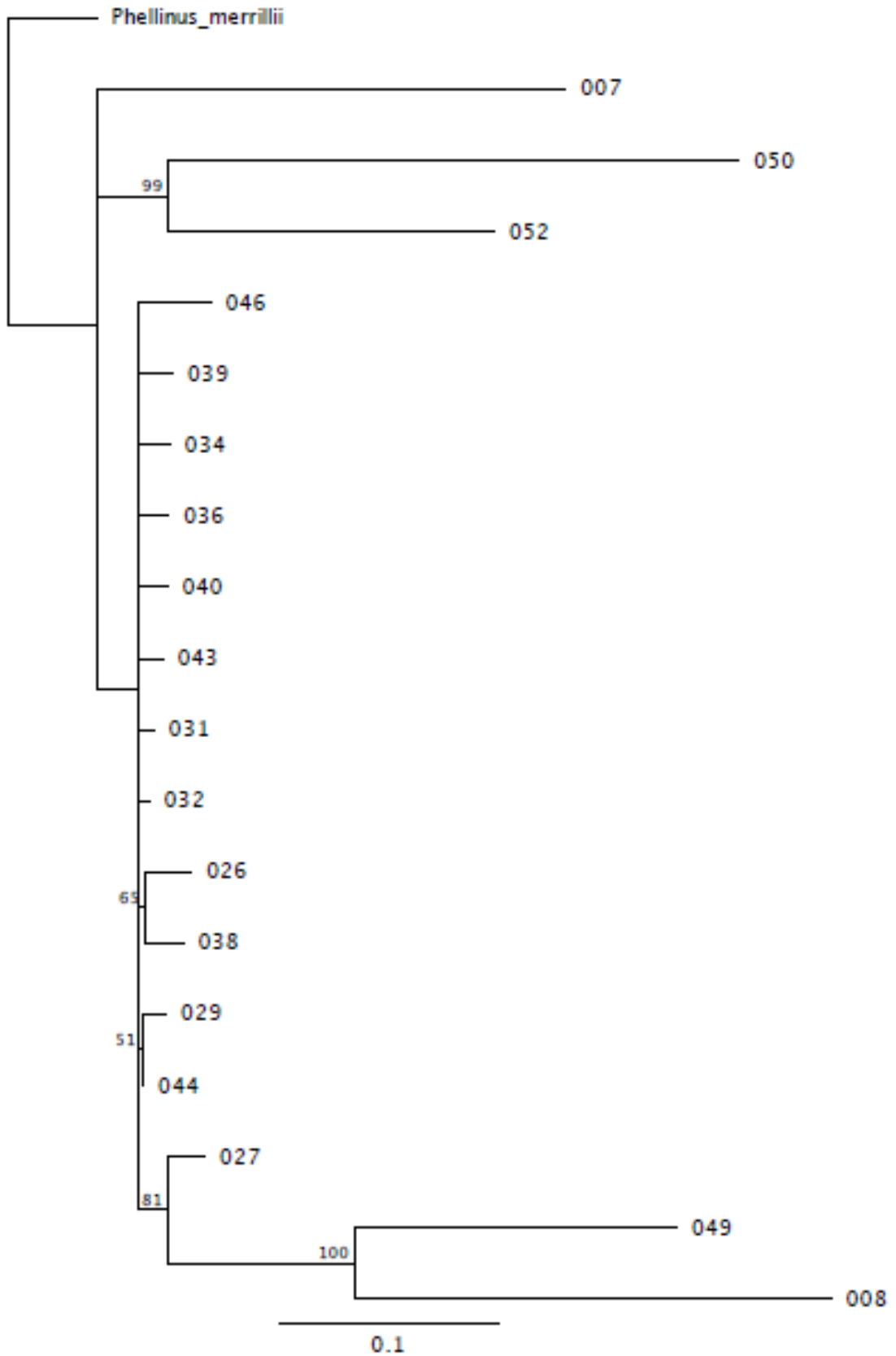


Figura 18: Árvore filogenética (*Neighbor Joining*) com as espécimes de *Phellinus\_piptadeniae* da região de Botucatu e Campinas, obtida pela análise de sequência de LSU e ITS rDNA concatenadas (Bayesiana).

A partir da topologia obtida nas árvores, pode-se discutir que embora as árvores de Máxima Verossimilhança tenham sido pouco resolutivas, as árvores de distancia (*Neighbor Joining*) que, todavia são mais matemáticas que evolutivas, trouxeram informações significativas: houve o arranjo de três clados fortemente sustentados pelos valores de *bootstrap*, sendo que um deles agrupa MF052 (espécime coletado na localidade tipo) separado do clado que inclui a maioria dos espécimes. O interessante é que esse arranjo que separa MF052 se mantém para nas árvores das duas regiões (ITS e LSU), assim como no arranjo da árvore cujos dados foram concatenados. A topologia não foi capaz de resgatar a monofilia do grupo.

Junto com a disposição dos clados e resgatando os dados de ocorrência *Phellinus piptadeniae* em três biomas diferentes (Mata Atlântica, Caatinga e Florestas Peruanas) é plausível a possibilidade de que podemos estar diante de um complexo com três linhagens evolutivas separadamente: aquela de ocorrência na parte Sul/Sudestes do Brasil, aquela de ocorrência no nordeste do Brasil (Caatinga) e a linhagem peruana, presente nas florestas secas.

A região ITS (embora *barcoding*) e a região LSU talvez não sejam as mais indicadas para se resolver relações de parentesco dentro do gênero *Phellinus*. Não podemos, porém, descartar a possibilidade de que o reconhecimento morfológico de espécie pode não representar grupos de espécies reais, sendo, algumas vezes, um conceito artificial.

No viés de que, preliminarmente, de fato o táxon seja um complexo de espécies, visto que de acordo com Rajchenberg & Pildain (2012), quando não existem diferenças morfológicas e não sendo feitos testes de compatibilidade é melhor entendê-los como um complexo, invariavelmente se remonta a ideia de especiação e seus processos. Especiação é o caminho pelo qual a biodiversidade é gerada. Embora as topologias da árvores tenham sido pouco resolutivas, com clados muitas vezes fracamente sustentados, é possível discorrer sobre a necessidade de entender especiação resgatando o conceito de espécie, ou seja, os critérios capazes de delimitar espécie (Taylor et al 2000). E é justamente nesse momento em que nos deparamos com múltiplas interpretações: Conceito Biológico de espécie, Conceito morfológico de espécie, Conceito Ecológico de espécie, Conceito Filogenético de espécie; vários modos de especiação podem ocorrer (Giraud, 2008). Por enquanto, a conclusão é que *Phellinus piptadeniae* representam um complexo taxonômico

de espécies que está passando por um processo de especiação. Em outras palavras, ainda há a necessidade de uma interpretação biogeográfica da filogenia do grupo na tentativa de elucidá-la.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARAL, H.O. 1987. **Lugol's solution/IKI versus Melzer's reagent**. Mycotaxon, 29: 399-450.
- BORBA-SILVA, M. A. 2013 **Aspectos sobre a ecologia e taxonomia de fungos poliporóides s.l. (Basidiomycota) da Mata Atlântica de Santa Catarina, Brasil. Florianópolis**. 43f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2013.
- DECOCK, C., S.H. FIGUEROA, G. ROBLEDO, G. CASTILLO. 2007. ***Fomitiporia punctata* (Basidiomycota, Hymenochaetales) and its presumed taxonomic synonyms in America: taxonomy and phylogeny of some species from tropical/subtropical areas**. Mycologia 99(5): 733-52.
- DRECHSLER-SANTOS, E.R. 2010. **Diversidade de agaricomycetes lignolíticos no semi-árido Brasileiro**. 247f. Tese (doutorado em Micologia) - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, 2010.
- DRECHSLER-SANTOS, E.R., Santos, P.J.P., Gibertoni, T.B. & Cavalcanti, M.A.Q. 2010. **Ecological aspects of Hymenochaetaceae in an area of Caatinga (semi-arid) in Northeast Brazil**. Fungal Diversity 42: 71–78.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. 1987. **A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue**. Phytochemical Bulletin, 19:11-15.
- FIDALGO, O. 1968. **As microestruturas e sua importância na sistemática dos fungos superiores**. Rickia 3: 117-159
- FISHER, M. AND M. BINDER. 2004. **Species recognition, geographic distribution and host-pathogen relationships: a case study in a group of lignicolous basidiomycetes, *Phellinus* s.l.** Mycologia 96 (4): 799-811.
- GARDES, M.; BRUNS, T D. 1993. **ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts**. Mol. Ecol., 2: 113-118.

- GIRAUD, T.; REFREGIER, G.; GAC, L. M. DE VIENNE, M.D.; HOOD, E. M. 2008. **Speciation in fungi**. *Fungal Genetics and Biology* 45 (2008) 791–802.
- GRÄSER Y, EL FARI M, VILGALYS R, KUIJPERS AF, DE HOOG GS, PRESBER W. 1999. **Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region**. *Med Mycol.* 37(2):105-14.
- GUGLIOTTA, A. M.; POSCOLERE, G. D; CAMPACCI, T. V. S. 2011. **Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil: Fungos, 10: Ganodermataceae**. *Hoehnea*, v. 38, n. 4, Dec.
- KIRK, P.M.; Cannon, P.F.; Minter, D.W. & Stalpers, J.A. 2008. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 10th ed. Wallingford, CAB International.
- KLEIN, R.M. **Ecologia da flora e vegetação do Vale do Itajaí**. *Sellowia*, Itajaí, v.31/32, p.9-389, 1979.
- RAJCHENBERG, M. AND M.B. PILDAIN. 2012. **Molecular studies reveal a speciation process within *Ryvardenia cretacea* (Polyporales, Basidiomycota)**. *Kurtziana* 37(1): 7-13.
- RODERJAN, C.V.; KUNIYOSHI, Y.S. **Macrozoneamento florístico da Área de Proteção Ambiental (APA -Guaraqueçaba)**. Curitiba: FUPEF, 1988. 53p. (FUPEF. Série Técnica, 15).
- RYVARDEN, L. 1991. *Genera of Polypores. Nomenclature and Taxonomy*. Oslo, Fungiflora.
- RYVARDEN, L.2004 *Neotropical Polypores. Part 1. Introduction, Ganodermataceae & Hymenochaetaceae. Synopsis Fungorum*, v. 19, p. 1-227.
- SALVADOR-MONTOYA, C. A. 2014. **Revisão taxonômica do complexo *Phellinus rimosus* de regiões semiáridas tropicais**. 147f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2014.
- TORRES-TORRES, M. G; GUZMÁN-DÁVALOS, L. 2012. **The morphology of *Ganoderma* species with a laccate surface**. *Mycotaxon*, 119: (16 ) 201-216.
- URCELAY, C., A. ROMERO AND G. ROBLEDO. 2012. **Taxonomy and Systematics of fungi from South America – a special issue in honoring Leif Ryvarden: Introduction** . *Kurtziana* 37(1): 3-6.

- ZHOU, L. W. 2014 **Notes on the taxonomic positions of some Hymenochaetaceae (Basidiomycota)**. *Phytotaxa* 177 (3): 183–187.
- WAGNER, T., FISCHER, M. 2002. **Proceedings towards a natural classification of the worldwide taxa *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l., and phylogenetic relationships of allied genera**. *Mycologia* 94:998-1016.
- WATLING, R. 1969. **Colour Identification Chart**. Edinburgh, Her Majesty's Stationery Office.
- WHITE, T. J.; BRUNS, S. L.; TAYLOR, J. W. 1990. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Eds.: INNIS, M. A., D. H. GELFAND, J. J. SNINSKY, AND T. J. WHITE. Academic Press, Inc., New York, p. 315-322.