



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NELSON CORREIA DE LIMA JÚNIOR

DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES EM HYMENOGHAETACEAE DONK
(BASIDIOMYCOTA, FUNGI) A PARTIR DE DADOS MORFOLÓGICOS E DNA
BARCODING

RECIFE, 2016

NELSON CORREIA DE LIMA JÚNIOR

**DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES EM HYMENOGASTRACEAE DONK
(BASIDIOMYCOTA, FUNGI) A PARTIR DE DADOS MORFOLÓGICOS E DNA
*BARCODING***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biotecnologia

Linha de Pesquisa: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dra. Leonor Costa Maia

Co-orientador: Dra. Tatiana B. Gibertoni

RECIFE, 2016

NELSON CORREIA DE LIMA JÚNIOR

**DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES EM HYMENOGASTRACEAE DONK A PARTIR
DE DADOS MORFOLÓGICOS E DNA *BARCODING***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2016

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dra. Leonor Costa Maia (Orientadora) / Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Elaine Malosso / Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Juliano Marcon Baltazar / Universidade Federal de São Carlos

Dr. Rafael Baptista Louzada / Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Valdir Queiroz Balbino / Universidade Federal de Pernambuco

SUPLENTE

Dra. Ana Maria Benko Iseppon / Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Gladstone Alves da Silva / Universidade Federal de Pernambuco

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Lima Júnior, Nelson Correia de

Delimitação de espécies em Hymenochaetaceae Donk (Basidiomycota, Fungi) a partir de dados morfológicos e DNA barcoding. / Nelson Correia de Lima Júnior - Recife: O Autor, 2016.

92 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Leonor Costa Maia

Coorientadora: Tatiana Baptista Gibertoni

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biotecnologia, 2016.

Inclui referências

1. Basidiomycota 2. DNA 3. Filogenia I. Maia, Leonor Costa (orient.) II. Gibertoni, Tatiana Baptista (coorient.) III. Título

579.59

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-405

*Ao meu sobrinho Carlos Arthur (em memória) que com
seus 10 dias de luta pela vida mostrou-me que tudo tem
um propósito que pode ir além da razão,*

Dedico

AGRADECIMENTOS

No presente trabalho, agradeço às pessoas e instituições que colaboraram de forma direta ou indireta na execução desta pesquisa:

Aos meus pais Nelson Lima (em memória) e Riselma Lima pela educação, paciência e incentivo incondicional ao longo da vida.

À minha irmã Emyliane Lima e ao meu cunhado Carlos Costa pelo incentivo incondicional, além dos meus sobrinhos Carlos Arthur (em memória) e Emily Lima.

À minha orientadora, Dra. Leonor Costa Maia, pelo apoio irrestrito na execução deste trabalho. Espero ter correspondido às expectativas.

À minha co-orientadora, Dra. Tatiana Baptista Gibertoni, pela dedicação, paciência e respeito ao longo desses oito anos de convívio. Obrigado por tudo!

À minha orientadora da graduação e mestrado, Dra. Elaine Malosso, por toda confiança depositada desde o início de minha jornada científica.

Ao Dr. Gladstone Silva pelos valiosos ensinamentos, mostrando-se acessível sempre que solicitado.

À chefia do Departamento de Antibióticos da UFPE pela flexibilidade de minha jornada de trabalho, em especial às Dras. Norma Gusmão, Teresinha Gonçalves e Silene Carneiro.

À Dra. Heidi Lacerda da Plataforma de Sequenciamento/Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas da UFPE pelo suporte, mostrando-se sempre prestativa quando solicitada.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) e do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PPGBF) da UFPE pelos aprendizados que levarei por toda a vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [PROTAX (562106/2010-3), Sisbiota (563342/2010-2), Universal (470303/2009-3, 472792/2011-3); PPBio Semi-Árido (558317/2009-0)] e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (APQ-0788-2.03/12) pelo suporte financeiro.

Aos amigos e companheiros de pesquisa do Deptº de Micologia/UFPE (Carla Lira, Rafael Vilela, Renan Nascimento, Phellipe Oller, Allyne Silva, Araeska Carena, Renata Chikowski, Priscylla Sobreira, Victor Coimbra, Cléverton Mendonça, Angelina Ottoni, Adriene Soares, Carlos Fragoso e Susane Chang) e do Deptº de Antibióticos (Maria

Rodrigues, Jaciana Aguiar e Thiago David) por tornarem a rotina de experimentos mais agradável.

Meus sinceros agradecimentos a todos os amigos de minha cidade, Vitória de Santo Antão (PE), em especial Débora Xavier, Ricardo Xavier, Maelle Martins, Diogo Filipi, Jonathas Gabriel Arruda, Irlanda Arruda, Pamella Dornelas, Everton Douglas, Patrícia Neri, Luann Ribeiro, Anderson Santos, Allan Víctor, Olga Sophia e Kécia Santana. Obrigado pela compreensão durante os constantes momentos em que estive ausente.

RESUMO GERAL

Hymenochaetaceae Donk (Basidiomycota, Fungi) caracteriza-se por apresentar basidiomas ressupinados a pileados, reação xantocróica positiva, presença de setas himeniais (na maioria) e de hifas generativas sem grampos de conexão, além de reunir fungos causadoras de podridão branca. A circunscrição dos gêneros e espécies em Hymenochaetaceae é imprecisa, principalmente no âmbito da taxonomia tradicional, o que torna dúbia a identificação de espécies quando são utilizados exclusivamente dados morfológicos. Nessa perspectiva, estudos baseados em sequências de DNA das regiões ITS e LSU (rDNA) estão sendo responsáveis por significativos progressos na taxonomia do grupo, porém estudos com táxons neotropicais são escassos. No presente estudo foram utilizados espécimes de Hymenochaetaceae coletados em diferentes biomas brasileiros para extração de DNA genômico, amplificação das regiões ITS e LSU por meio de PCR e posterior sequenciamento. Foi observado o delineamento morfológico e/ou molecular de duas espécies de *Fomitiporia*, duas de *Fulvifomes*, quatro de *Fuscoporia*, seis de *Hymenochaete*, duas de *Phellinotus*, uma de *Phellinus* e uma de *Tropicoporus*. Dentre essas, são propostas: uma nova espécie de *Fuscoporia*; uma sinonimização em *Phellinus*, uma em *Tropicoporus*, uma em *Hymenochaete* e uma possível sinonimização em *Fomitiporia*; além da confirmação de combinação *Fulvifomes rhytiphloeus* a partir de evidências moleculares. São registradas ainda uma nova ocorrência de *Fomitiporia* e de *Hymenochaete* para o Brasil. De modo geral, observou-se que as sequências da região ITS e/ou LSU foram úteis no delineamento das espécies em estudo, principalmente em espécies morfolologicamente semelhantes e próximas do ponto de vista evolutivo.

Palavras-chave: Hymenochaetales; neotrópicos; *Phellinus*; rDNA; sistemática.

ABSTRACT

Hymenochaetaceae Donk (Basidiomycota, Fungi) is characterized by sessile or pileate basidiomes, positive xanthochroic reaction, occurrence of hymenial setae (frequent) and absence of clamps. Besides, species of this group are also known for producing white rot. The circumscription of genera and species within Hymenochaetaceae is inaccurate, especially under the traditional taxonomy, which makes dubious species identification when used exclusively morphological data. From this perspective, studies based on DNA sequences of the regions ITS and LSU (rDNA) are accounting for significant progress in the taxonomy of the group, but studies with Neotropical taxa are scarce. In this study, Hymenochaetaceae specimens were collected in different Brazilian biomes for DNA extraction, amplification of the regions ITS and LSU by PCR and subsequent sequencing. We observed the morphological and/or molecular delimitation of two species of *Fomitiporia*, two of *Fulvifomes*, four of *Fuscoporia*, seven of *Hymenochaete*, two of *Phellinotus*, one of *Phellinus* and one of *Tropicoporus*. Among these it is proposed: a new species of *Fuscoporia*; one synonymization in *Phellinus*, one in *Tropicoporus*, one in *Hymenochaete* and a possible synonymization in *Fomitiporia*; and a confirmation of the combination in *Fulvifomes rhytiphloeus* upon molecular data. We also report a new record of *Fomitiporia* and another of *Hymenochaete* from Brazil. In general, it was observed that sequences of ITS and/or LSU region are useful for species delimitation, particularly for those which are morphologically similar and evolutionarily close related.

Keywords: Hymenochaetales; neotropics; *Phellinus*; rDNA; systematic.

Lista de abreviaturas

BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BA	Inferência Bayesiana
IC	Índice de Consistência de uma reconstrução pelo método MP
IR	Índice de Retenção de uma reconstrução pelo método MP
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> do rDNA
LSU	<i>Large Subunit</i> do rDNA
MP	Reconstrução filogenética pelo método de Máxima Parcimônia
MV	Reconstrução filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Pb	Pares de bases nitrogenadas
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorfism DNA</i>
rDNA	DNA ribossomal
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
s.s.	<i>sensu stricto</i>
s.l.	<i>sensu lato</i>

Lista de Figuras

	Página
Figura 01	Representação esquemática da unidade de repetição de rDNA dos eucariotos, composto pelo genes 18S/SSU, 5.8S e o gene 28S/LSU espaçados pelas regiões ITS 1 e 2 (Begerow <i>et al.</i> , 2009).....
	24
Figura 02	Porcentagem de variabilidade intraespecífica encontrada no Reino Fungi: (A) Região ITS1, (B) Região ITS2, e (C) ITS1-5.8S-ITS2 combinadas.....
	27
Figura 03	Sucesso de amplificação por PCR e sequenciamento das regiões ITS, LSU, SSU, e RPB1 a partir de espécimes dos filos Ascomycota (A) e Basidiomycota (B). Os gráficos indicam a proporção de sucesso das tentativas de amplificação. Preto: PCRs e sequências obtidas com sucesso; Cinzentos: casos duvidosos (mais de uma banda de DNA amplificada); Branco: PCR sem êxito. (Schoch <i>et al.</i> , 2012).....
	28
Figura 04	Sucesso de amplificação por PCR e sequenciamento das regiões ITS, LSU, SSU, e RPB1 a partir de espécimes dos filos Ascomycota e Basidiomycota, A e B, respectivamente. Os gráficos indicam a proporção de sucesso das tentativas de amplificação. Preto: PCRs e sequências obtidas com sucesso; Cinzentos: casos duvidosos (mais de uma banda de DNA amplificada); Branco: PCR sem êxito. (Schoch <i>et al.</i> , 2012).....
	29
Figura 05	Reconstrução filogenética de Hymenochaetaceae baseada no alinhamento de 819 nucleotídeos da região LSU. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de Bootstrap (%) foram gerados a partir do método Máxima Verossimilhança (MV) e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA) são, respectivamente, apresentados. Árvore Filogenética LSU.....
	49
Figura 06	Reconstrução filogenética de Hymenochaetaceae baseada no alinhamento de 1217 nucleotídeos da combinação da região ITS e LSU. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de Bootstrap (%) foram gerados a partir do método Máxima Verossimilhança (MV) e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA) são, respectivamente, apresentados....
	51
Figura 07	Reconstrução filogenética de <i>Fuscoporia</i> baseada no alinhamento de 391 nucleotídeos da região ITS. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de Bootstrap (%) foram gerados a partir do método de Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (MV), e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA), respectivamente. Para MP: Índice de Consistência (CI) = 0.6055 e Índice de Retenção (RI) = 0.9023. *Área de coleta não disponível.....
	61
Figura 08	Reconstrução filogenética de <i>Fuscoporia</i> baseada no alinhamento

	de 789 nucleotídeos da região LSU. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de Bootstrap (%) foram gerados a partir do método de Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (MV), e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA), respectivamente. Para MP: Índice de Consistência (CI) = 0.5909 e Índice de Retenção (RI) = 0.8808. *Área de coleta não disponível.....	62
Figura 09	Reconstrução filogenética de <i>Fuscoporia</i> baseada no alinhamento de 1173 nucleotídeos relativos a combinação das regiões ITS e LSU. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de Bootstrap (%) foram gerados a partir do método de Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (MV), e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA), respectivamente. Para MP: Índice de Consistência (CI) = 0.8917 e Índice de Retenção (RI) = 0.8917. *Área de coleta não disponível.....	63
Figura 10	Morfologia de <i>F. callimorpha</i> . A. Basidioma; B e C. Setas himeniais; D. Basidiosporos. Escala: A = 1 cm; B and C = 5 µm; Fig. D = 10 µm.....	64
Figura 11	Morfologia de <i>F. wahlbergii</i> . A. Basidioma; B e C. Setas himeniais; D. basidiosporos. Escala: A = 1 cm; B and D = 10 µm; C = 5 µm.....	66
Figura 12	Morfologia de <i>F. paracallimorpha</i> , sp. nov. A. Basidioma; B e C. Setas himeniais; D. Basidiosporos. Escala: A = 1 cm; B-D = 10 µm.	68
Figura 13	Morfologia de <i>F. gilva</i> . A. Basidioma; B e C. Setas himeniais; D. Basidiosporos. Escala: A = 1 cm; B-C = 10 µm.....	70
Figura 14	Reconstrução filogenética de <i>Hymenochaete</i> baseada no alinhamento de 718 nucleotídeos da região ITS. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de Bootstrap (%) foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (MV), e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA).....	72
Figura 15	Reconstrução filogenética de <i>Hymenochaete</i> baseada no alinhamento de 801 nucleotídeos da região LSU. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de Bootstrap (%) foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (MV), e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA).....	73
Figura 16	Reconstrução filogenética de <i>Hymenochaete</i> baseada no alinhamento de 1519 nucleotídeos relativos a combinação das regiões ITS e LSU. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de Bootstrap (%) foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (MV), e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA).....	74

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1	Lista dos espécimes de Hymenochaetaceae utilizados no presente estudo e coletados nas seguintes complexos vegetacionais do Brasil: Amazônia: Floresta Nacional (FLONA) de Caxiuanã (Pará), Estação Ecológica (EE) de Cuniã (Rondônia) e Reserva Duck (Manaus); Mata Atlântica: Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Frei Caneca (Pernambuco), Parque Estadual (PE) de Ilha Grande, Parque Nacional (PARNA) da Tijuca e PARNA Itatiaia (Rio de Janeiro); Caatinga: Serra da Jibóia (Bahia), FLONA Araripe-Apodi (Ceará), Reserva Estadual (RE) Mata do Pau-Ferro (Paraíba), PARNA do Catimbau, Mata do Estado e Sítio Carro Quebrado (Pernambuco), PARNA Serra das Confusões (Piauí); Cerrado: PARNA de Brasília (Distrito Federal). CO = Centro-Oeste; NE= Nordeste, NO = Norte, SE = Sudeste e S = Sul.....	31
Tabela 2	Lista de sequências das regiões ITS e/ou LSU de espécimes de <i>Hymenochaetaceae</i> depositadas no GenBank utilizadas neste estudo.....	38
Tabela 3	Tamanho das setas himeniais e abhimeniais de <i>H. damicornis</i> e <i>H. reniformis</i> de acordo com diferentes autores	76

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 CARACTERIZAÇÃO, IMPORTÂNCIA E TAXONOMIA DE HYMENOGASTRACEAE.....	16
2.2 AVANÇOS E PERSPECTIVAS DA TAXONOMIA MOLECULAR DE FUNGOS.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	31
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS-ALVO E SEQUENCIAMENTO.....	36
3.3 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO E AMPLIFICAÇÕES DAS REGIÕES- ALVO.....	46
4.2 TAXONOMIA MOLECULAR DE <i>HYMENOGASTRACEAE</i> DONK.....	47
4.2.1 Taxonomia morfológica e molecular de <i>Fulvifomes</i> Murrill.....	52
4.2.2 Taxonomia morfológica e molecular de <i>Phellinotus</i> Drechsler-Santos, Robledo & Rajchenb.....	53
4.2.3 Taxonomia morfológica e molecular de <i>Tropicoporus</i> L.W. Zhou, Y.C. Dai & Sheng H. Wu.....	55
4.2.4 Taxonomia morfológica e molecular de <i>Phellinus</i> Quél.....	56
4.2.5 Taxonomia morfológica e molecular de <i>Fomitiporia</i> Murrill.....	57
4.2.6 Taxonomia morfológica e molecular de <i>Fuscoporia</i> Murrill.....	59
4.2.7 Taxonomia morfológica e molecular de <i>Hymenochaete</i> Lév.....	70
5. CONCLUSÕES.....	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um dos maiores grupos de organismos em número de espécies, diversidade e significância ecológica, incluindo, pela estimativa mais recente, 5,1 milhões de espécies (BLACKWELL, 2011). Considerando que foram descritas pouco menos de 100.000 espécies até recentemente (KIRK, 2008), o conhecimento atual corresponderia a menos de 2% da diversidade do grupo e, desta, uma porcentagem ainda menor foi estudada filogeneticamente (BEGEROW *et al.*, 2010; RILEY *et al.*, 2014).

O filo Basidiomycota é caracterizado pela produção de basidiosporos (esporos sexuais) em estruturas especializadas denominadas basídios (KIRK, *et al.*, 2008) e seus representantes são conhecidos popularmente como orelhas de pau, cogumelos, estrelas da terra e boletos (Agaricomycetes), além das ferrugens (Pucciniomycetes) e dos carvões (Ustilaginomycetes) (HIBBETT *et al.*, 2007).

Em Agaricomycetes, a família Hymenochaetaceae Donk é uma das mais representativas, caracterizada por apresentar basidiomas ressupinados a pileados, reação xantocrômica positiva, presença de setas himeniais (na maioria) e de hifas generativas sem grampos de conexão. Os representantes do grupo também são conhecidos por causarem podridão branca na madeira (WAGNER & FISCHER, 2002a; KIRK *et al.*, 2008; RAJCHENBERG *et al.*, 2015). Primeiramente reconhecida como grupo por Patouillard (1900), a família Hymenochaetaceae foi proposta posteriormente por Donk (1948).

Além da importância ecológica, várias espécies de Hymenochaetaceae têm sido alvo de estudos farmacológicos devido às reconhecidas propriedades medicinais. Compostos isolados a partir de basidiomas de algumas espécies possuem comprovada atividade antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória (JANG *et al.*, 2004; BAE *et al.*, 2005a, b; LI *et al.*, 2004; DONG *et al.*, 2009).

A circunscrição dos gêneros em Hymenochaetaceae é imprecisa, principalmente no âmbito da taxonomia tradicional. Porém, com a utilização de dados moleculares (sequências de DNA ribossomal), observaram-se subseqüentes segregações a partir de *Phellinus* Quél. e *Inonotus* Karst. (maiores gêneros da família), como *Arambarria* Rajchenb. & Pildain, *Inocutis* Fiasson & Niemelä, *Fomitiporella* Murrill, *Fulvifomes* Murrill, *Fomitiporia* Murrill e *Fuscoporia* Murrill anteriormente inseridos em *Phellinus* sensu lato (WAGNER & FISCHER, 2001, 2002a; RAJCHENBERG *et al.*, 2015); e *Pseudoinonotus* T. Wagner & M. Fisch., *Sanghuangporus* Sheng H. Wu, L.W. Zhou &

Y.C. Dai e *Tropicoporus* L.W. Zhou, Y.C. Dai & Sheng H. Wu, antes pertencentes ao complexo *Inonotus* (RAJCHENBERG *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2015).

Além disso, muitas espécies nesses gêneros e nos demais da família foram descritas com base em variações morfológicas e filogenéticas discutíveis e, em alguns casos, sem levar em consideração a localidade geográfica dos espécimes-tipo (LÉGER, 1998; DAI *et al.*, 2008; AMALFI *et al.*, 2010; HE & DAI, 2012; AMALFI & DECOCK, 2013; TIAN *et al.*, 2013; ZHOU, 2014, 2015; ZHOU *et al.*, 2015). Soma-se a isso a carência de inclusão de espécies neotropicais (CAMPOS-SANTANA *et al.*, 2014; PIRES *et al.*, 2015).

No Brasil, estudos filogenéticos em Hymenochaetaceae com propósitos taxonômicos são escassos (GÓES-NETO *et al.*, 2002; BALTAZAR *et al.*, 2014; CAMPOS-SANTANA *et al.*, 2014; PIRES *et al.*, 2015). Nessas abordagens, o grupo de genes mais utilizado é o que codifica o rRNA e, entre eles, destacam-se as regiões ITS e LSU (rDNA).

Neste trabalho foi testada a hipótese de que espécimes de Hymenochaetaceae coletados no Brasil podem abranger espécies somente delimitadas (nível específico e genérico) a partir de dados moleculares. Nesse contexto, objetivou-se combinar a taxonomia morfológica com análises de sequências das regiões ITS e LSU (rDNA) para distinção e posicionamento filogenético de gêneros e espécies dessa família.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Caracterização, importância e taxonomia de Hymenochaetales

O Reino Fungi constitui um dos maiores reinos em número de espécies, diversidade e significância ecológica e biotecnológica. Por serem decompositores naturais, os fungos participam praticamente de quase todas as transformações físicas ou químicas na natureza (BLACKWELL, 2011; TAYLOR *et al.*, 2014).

O filo Basidiomycota compreende mais de 30% das espécies hoje conhecidas para o reino (RILEY *et al.*, 2014) e caracteriza-se pela presença de estruturas especializadas denominadas basídios (KIRK *et al.*, 2008; YANG, 2011), onde ocorrem cariogamia e meiose, processos que resultam na formação dos basidiosporos. Os representantes desse filo são popularmente conhecidos como boletos, cogumelos, estrelas da terra e orelhas de pau, constituindo a classe Agaricomycetes, além das ferrugens e dos carvões, fitoparasitas que representam as classes Pucciniomycetes e Ustilaginomycetes, respectivamente (HIBBETT *et al.*, 2007; RILEY *et al.*, 2014).

Agaricomycetes compreende cerca de 21.000 espécies (KIRK *et al.*, 2008) que se destacam como principais causadoras de podridão em madeira. Pela capacidade de degradar lignina e/ou celulose, e hemicelulose, são denominadas lignolíticas ou lignocelulolíticas. Dessa forma, desempenham importante papel nos ecossistemas por promoverem a ciclagem de nutrientes (YANG, 2011).

Hymenochaetales Donk, uma das famílias mais representativas dessa classe, é caracterizada por apresentar basidiomas resupinados a pileados, reação xantocróica positiva (a trama escurece na presença de KOH), presença de setas himeniais (na maioria) e de hifas generativas sem grampos de conexão. Seus representantes são predominantemente sapróbios ou parasitas facultativos e/ou obrigatórios de árvores, causando podridão branca (WAGNER & FISCHER, 2001, 2002a; KIRK *et al.*, 2008).

Muitas espécies de Hymenochaetales são constantemente investigadas em relação às possíveis propriedades medicinais. Compostos isolados a partir de algumas espécies possuem comprovada atividade antioxidante, antitumoral e antiinflamatória (JANG *et al.*, 2004; BAE *et al.*, 2005 a, b; LI *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2007; LU *et al.*, 2009; DONG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011).

Essa família foi primeiramente estudada como tal por Patouillard (1900), que criou o termo *Série des Igniaries* para alocar espécies com um tipo peculiar de cistídio (atualmente

setas himeniais). Esta organização se tornou base para a criação da subfamília Hymenochaetoidae (DONK, 1931; 1933) e, posteriormente, da família Hymenochaetaceae (DONK, 1948), acomodando todas as espécies que possuíam setas himeniais. No mesmo ano, Corner (1948) preferiu criar o termo *Xanthochroic Series* para acomodar as espécies que apresentassem reação xantocróica positiva, porém sem levar em consideração a presença de setas himeniais. Esta classificação não foi aceita e Oberwinkler (1977), baseando-se nos estudos de Donk (1931, 1933, 1948), criou a ordem Hymenochaetales e confirmou a presença de setas himeniais como principal característica sinapomórfica do grupo.

Fiasson & Niemelä (1984), ao realizarem uma extensa revisão dos caracteres macro-micromorfológicos relevantes em Hymenochaetales, consideraram a ordem formada por duas sub-ordens: Phaeolinae e Hymenochaetinae, abrangendo quatro famílias: Phaeoaceae Jülich, em Phaeolinae e Hymenochaetaceae Donk, Inonotaceae Fiasson & Niemelä e Phellinaceae Jülich em Hymenochaetinae.

Phaeoaceae era representada pelos gêneros *Coltricia* S.F. Gray e *Phaeolus* Pat. [este último não mais considerado Hymenochaetales por causar podridão castanha (Ryvarden 1991)] e Hymenochaetaceae *sensu* Fiasson & Niemelä (1984) pelos gêneros que apresentavam himênio não poróides (*Asterodon* Pat., *Hydnochaete* Bres. e *Hymenochaete* Lév.). Os demais gêneros foram alocados nas outras duas famílias: Inonotaceae com *Inonotus* Karst., *Inocutis* Fiasson & Niemelä e *Phylloporia* Murrill e Phellinaceae com *Onnia* Karst. e *Inonotopsis* Murrill, além dos sete gêneros derivados de *Phellinus* Quél.: *Fomitiporia* Murrill, *Porodaedalea* Murrill, *Ochroporus* J. Schröt., *Fulvifomes* Murrill (complexo *Phellinus rimosus*), *Phellinidium* (Kotl.) Fiasson & Niemelä, *Fuscoporia* Murrill (complexo *P. ferreus*) e *Phellinus* Quél. s.s. (complexo *P. torulosus*). No entanto, esta classificação foi questionada, pois Fiasson & Niemelä (1984) basearam-se principalmente em espécies européias, não levando em conta inúmeras espécies tropicais descritas até então (WAGNER & FISCHER, 2001, 2002a, b).

Historicamente, vários caracteres morfológicos, anatômicos, fisiológicos, sexuais e ecológicos foram estudados em Hymenochaetaceae e demonstraram que a família constitui um grupo bastante heterogêneo (FIASSON, 1982; FIASSON & NIEMELÄ, 1984; FISCHER, 1996; DAI, 1999). Como resultado, a circunscrição dos gêneros na família é imprecisa no âmbito da taxonomia tradicional. A mesma situação ocorre ao nível genérico, principalmente em *Phellinus* s.l. e *Inonotus* s.l. que compreendem mais da metade das

espécies do grupo (WAGNER & FISCHER, 2001, 2002a; RAJCHENBERG *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2015).

Phellinus s.l. e *Inonotus s.l.* foram inicialmente segregados entre si de acordo com o tipo do basidioma e da organização do sistema hifálico. *Phellinus s.l.* compreendia espécies caracterizadas por possuírem basidiomas perenes e sistema hifálico dimítico, enquanto as espécies que possuísem basidiomas anuais e sistema hifálico monomítico foram enquadradas em *Inonotus s.l.* (PILÁT, 1936, 1942; CUNNINGHAM, 1947), porém esta diferenciação foi questionada já que esses caracteres não se apresentam de modo uniforme (DOMANSKI, *et al.*, 1973; JAHN, 1981; FIASSON & NIEMELÄ, 1984; CORNER, 1991; DAI, 1995, 1999; HANSEN & KNUDSEN, 1997). Por exemplo, os basidiomas de *P. gilvus* (Schwein.) Pat. e *I. dryadeus* (Pers.) Murrill são anuais e o sistema hifálico é dimítico. Já *P. pachyphloeus* (Pat.) Pat., *P. ribis* (Schumach.) Quél. e *P. robustus* (P. Karst.) Bourdot & Galzin apresentam basidioma perenes, porém com sistema hifálico monomítico ou com transição entre monomítico e dimítico (FIASSON & NIEMELÄ, 1984; CORNER, 1991; RYVARDEN & GILBERTSON, 1993, 1994; DAI, 1999).

Problemática similar também foi observada em *Hymenochaete* (gênero tipo da família) e gêneros afins (WAGNER & FISCHER, 2002b). Historicamente, alguns gêneros foram segregados a partir de *Hymenochaete* Lév. baseando-se em características morfológicas. *Hydnochaete* Bres., por exemplo, foi criado para acomodar as espécies com superfície himenial hidnóide, enquanto *Stiptochaete* Ryvarden para espécies com basidioma estipitado, além de *Dichochaete* Parmasto para espécies que apresentassem dicohifas (RYVARDEN, 1982, 1985; PARMASTO, 1995, 2000). Posteriormente, foi observado que essas características são artificiais em *Hymenochaete* (WAGNER & FISCHER, 2002b; HE & DAI, 2012; PARMASTO *et al.*, 2014).

A presença de espécies crípticas (espécies morfológicamente indiscerníveis, mas filodistintas) também é conhecida em Hymenochaetaceae, o que dificulta ainda mais a correta identificação das espécies. Em *Fuscoporia*, por exemplo, cujas espécies são comumente encontradas em regiões tropicais (RYVARDEN, 2004; BALTAZAR *et al.*, 2009), Vlasák *et al.*, (2011) comentaram que espécimes descritos como *F. callimorpha* (Lév.) Groposo, Log.-Leite & Góes-Neto poderiam abranger mais de uma espécie, e Insumran *et al.*, (2012), ao estudarem exemplares de *F. gilva* e de um táxon não identificado de *Fuscoporia*, a partir de sequências ITS (rDNA), apontaram que espécimes

com alta plasticidade fenotípica poderiam, na verdade, encobrir espécies geneticamente distintas.

Relato de gênero críptico também é conhecido para a família. É o que se observa, por exemplo, entre *Hymenochaete*, cujas espécies possuem himenóforo corticióide, hidnóide, lamelado ou poróide, e *Pseudochaete* T. Wagner & M. Fisch. (WAGNER & FISCHER, 2002b; HE & DAI, 2012; PARMASTO *et al.*, 2014), o qual foi segregado de *Hymenochaete* com base em sequências LSU (rDNA), mas que possui representantes com as mesmas características morfológicas do referido gênero.

Além disso, em Hymenochaetaceae, muitas espécies foram descritas com base em variações morfológicas discutíveis (DAI *et al.*, 2008; AMALFI *et al.*, 2010; HE & DAI 2012; AMALFI & DECOCK, 2013; TIAN *et al.*, 2013; ZHOU, 2014). Nesses casos, dados ecológicos, como localização geográfica, bioma, hábito e hospedeiro vegetal foram utilizados como principais características taxonômicas.

Todos esses fatos, somando-se à carência de taxonomistas especializados nos diferentes gêneros em Hymenochaetaceae, contribuem para que a delimitação de gêneros e espécies da família torne-se um desafio (WAGNER & FISCHER, 2002b; AMALFI *et al.*, 2010, 2013, 2014; PARMASTO *et al.*, 2014; CAMPOS-SANTANA *et al.*, 2014; PARMASTO *et al.*, 2014; RAJCHENBERG *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2015).

Embora a importância histórica dos caracteres morfológicos na elucidação do conceito de gêneros e na separação de complexos de espécies seja inquestionável, o uso exclusivo desses dados apresenta limitações. Desse modo, nos últimos anos, abordagens alternativas a partir de sequências de DNA em conjunto com dados morfológicos têm sido responsáveis por significativos progressos na identificação de espécies e na correta compreensão dos conceitos de gêneros em Hymenochaetaceae (WAGNER & FISCHER, 2001, 2002a, 2002b; LARSSON *et al.*, 2006; DAI *et al.*, 2008; HE & DAI 2012; INSUMRAN *et al.*, 2012; AMALFI *et al.*, 2013; PARMASTO *et al.*, 2014; TIAN *et al.*, 2013; BALTAZAR *et al.*, 2014; RAJCHENBERG *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2015).

Wagner & Fischer (2001, 2002a, b) esboçaram as primeiras filogenias da família baseados em sequências da região LSU (rDNA) provenientes basicamente de táxons europeus e norte-americanos. Também observaram o polifiletismo de *Phellinus s.l.* e *Inonotus s.l.*, e a partir destas observações confirmaram o status taxonômico de outros gêneros descritos preliminarmente com base na morfologia (WAGNER & FISCHER, 2001, 2002a); partindo de *Phellinus s.l.* estabeleceram subdivisões monofiléticas que

consideraram como os gêneros válidos na família: *Aurificaria* Reid, *Inocutis*, *Fomitiporella*, *Fulvifomes*, *Fomitiporia*, *Fuscoporia*, *Mensularia*, *Porodaedalea*, *Phylloporia* e *Onnia*, além de *Pseudoinonotus*, este último segregado de *Inonotus*. Além disso, Wagner & Fischer (2002b) confirmaram *Hymenochaete* como gênero filogeneticamente válido e, a partir deste, segregaram *Pseudochaete* que, embora morfológicamente compartilhe características similares, é distinto do ponto de vista filogenético.

Wagner & Fischer (2001, 2002b) demonstraram ainda que *Hymenochaete* forma um agrupamento monofilético com alto suporte estatístico, incluindo os até então gêneros válidos *Hydnochaete* e *Stiptochaete*. Em um estudo similar, Parmasto *et al.*, (2014) sinonimizaram *Dichochaete* a *Hymenochaete*, propondo a nova combinação *H. resupinata* [= *Dichochaete setosa* (Sw.) Parmasto].

Estes trabalhos foram fundamentais para a organização taxonômica de Hymenochaetaceae e, a partir de então, vários estudos passaram a realizar abordagens filogenéticas similares em conjunto com a taxonomia tradicional, porém utilizando táxons de diferentes localidades geográficas que até então não tinham sido estudadas (LARSSON *et al.*, 2006; LARSSON, 2007; DAI *et al.*, 2008; AMALFI *et al.*, 2010; YOMBIYENI *et al.*, 2010; HE & DAI, 2012; INSUMRAN, *et al.*, 2012; PARMASTO, *et al.*, 2014; TIAN *et al.*, 2013; AMALFI *et al.*, 2014; BALTAZAR *et al.*, 2014; RAJCHENBERG *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2015).

Recentemente, Rajchenberg *et al.*, (2015) propuseram o gênero *Arambarria* ao estudarem seis espécies de Hymenochaetaceae originárias da Patagônia (Argentina) com base em dados moleculares (sequências ITS e LSU). Os autores comentam que, embora se apresente como um grupo monofilético bem delimitado, este gênero não possui características morfológicas que permita diferenciá-lo dos demais gêneros da família.

Em um trabalho semelhante, porém com foco no complexo *Inonotus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teixeira, Zhou *et al.*, (2015) estudaram táxons chineses com base em dados moleculares (sequências ITS e LSU) e morfológicos, estabelecendo dois novos gêneros: *Sanghuangporus* e *Tropicoporus*.

Estudos moleculares em Hymenochaetaceae com exemplares provenientes do Brasil são escassos, existindo apenas duas publicações (GÓES-NETO *et al.*, 2002; Baltazar *et al.*, 2014; PIRES *et al.*, 2015).

Góes-Neto *et al.* (2002) esboçaram a primeira proposta de filogenia molecular (sequências D3/LSU) de Hymenogastreales neotropicais com base em uma espécie de *Aurificaria*, uma de *Hymenochaete*, oito de *Phellinus* e uma de *Phylloporia* utilizando exclusivamente materiais coletados no Brasil. Observaram ainda que as espécies analisadas formaram, cada uma delas, um grupo monofilético bem delimitado, porém esse monofiletismo não foi visto nem para *Phellinus s.l.* nem para o complexo *Phellinus rimosus*, o qual representa um grupo parafilético.

Anos mais tarde, Baltazar *et al.*, (2014), ao utilizarem sequências de ITS e LSU rDNA de espécimes de *Hydnochaete peroxydata* (Berk. ex Cooke) Dennis (= *Hydnum peroxydatum* Berk. ex Cooke, espécie tipo de *Hydnochaete*) coletados no Brasil, confirmaram que esta espécie posiciona-se com alto suporte estatístico no clado de *Hymenochaete s.s.* Desse modo, propuseram uma nova combinação: *Hymenochaete peroxydata* (Berk. ex Cooke) Baltazar, Gorjón & Rajchenb., ratificando as observações preliminares de He *et al.*, (2012) e Parmasto *et al.* (2014), que sugeriram a sinonimização de *Hydnochaete* a *Hymenochaete*, porém com base em outras espécies.

Desse modo ao analisar o estado atual da taxonomia de *Hymenogastreae*, assim como dos gêneros e respectivas espécies, evidencia-se que novos estudos filogenéticos com propósitos taxonômicos aliados a análises morfológicas acuradas são necessários para elucidação da confusão taxonômica atual do grupo, principalmente com base em espécies de áreas ainda não estudadas.

2.2 Avanços e perspectivas da taxonomia molecular de fungos

A identificação de organismos com base em dados morfológicos muitas vezes representa uma tarefa complexa, até mesmo para os taxonomistas mais experientes. Análises baseadas exclusivamente em dados morfológicos nem sempre são capazes de fornecer resoluções inquestionáveis, principalmente em grupos evolutivamente próximos (GÓES-NETO *et al.*, 2002; LAMROOD & GÓES-NETO, 2006; LARSSON *et al.*, 2006; DAI *et al.*, 2008; DAI 2010; YOMBIYENI *et al.*, 2010; HE & DAI, 2012; INSUMRAN *et al.*, 2012; AMALFI *et al.*, 2012, 2014; TIAN *et al.*, 2013; PARMASTO *et al.*, 2014). Além disso, a plasticidade fenotípica observada em algumas espécies comumente conduz a erros de identificação. Essa problemática evidenciou a necessidade de se utilizar novas

ferramentas em auxílio à taxonomia tradicional (TAUTZ *et al.*, 2003; INSUMRAN *et al.*, 2012; AMALFI & DECOCK, 2013).

Estudos recentes têm revelado a existência de inúmeras espécies biológicas que ao longo da evolução acumularam divergência genética sem o acompanhamento de diferenciações morfológicas (INSUMRAN *et al.*, 2012; PEČNIKAR & BUZAN 2013; AMALFI *et al.*, 2014; CAMPOS-SANTANA *et al.*, 2014) e que, portanto, não poderiam ser identificadas usando os conceitos da taxonomia tradicional. O reconhecimento dos limites existentes nas espécies ditas crípticas é um dos grandes desafios da taxonomia moderna (HEINRICHS *et al.*, 2011).

Com o advento das tecnologias de biologia molecular, surgiram diversos tipos de marcadores moleculares que detectam o polimorfismo genético diretamente no DNA (HIBBETT *et al.*, 2007; TAYLOR *et al.*, 2014). Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA correspondente ou não a regiões expressas do genoma, permitindo a análise da variabilidade genética entre organismos (FARAH, 2007). O princípio da utilização desses marcadores baseou-se no pressuposto de que diferenças genéticas denotam, na maioria das vezes, diferenças fenotípicas facilmente observadas ou não (FALEIRO, 2007). Entre as vantagens dos marcadores, pode-se citar a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos e a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente e em qualquer estágio do ciclo de vida (FALEIRO, 2007; GÓES-NETO, 2007).

Embora estudos baseados em dados morfológicos e/ou fisiológicos tenham contribuído consideravelmente na elucidação das relações filogenéticas entre diversos grupos fúngicos, a taxonomia micológica sofreu mudanças significativas após a aplicação das ferramentas moleculares. A década de 1990 foi considerada turbulenta para a sistemática dos fungos, pois muitos trabalhos baseados exclusivamente na taxonomia morfológica foram totalmente reavaliados (JAMES *et al.*, 2006; HIBBETT *et al.*, 2007; SEIFERT, 2009).

No entanto, essa reviravolta nos estudos da taxonomia só foi possível devido a uma descoberta que revolucionou as pesquisas relacionadas à biologia molecular. Em 1985, Kary Mullis, um bioquímico que trabalhava com síntese química de oligonucleotídeos em uma empresa de biotecnologia da Califórnia (Cetus Corporation) desenvolveu a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *polymerase chain reaction*) (SCHLÖTTERER, 2004; FARAH, 2007; SCHULMAN, 2007; MATIOLI & PASSOS-

BUENO, 2012). O impressionante é que todos os elementos necessários para o desenvolvimento dessa técnica não eram novidade até então na área de biologia molecular. A vantagem é que Kary Mullis, além de ter profundo conhecimento na área de biologia molecular, também era programador de computadores (Matioli & Passos-Bueno 2012).

Uma vez estabelecida, esta técnica ganhou aceitação quase que imediatamente na micologia e aumentou consideravelmente a eficiência da detecção de polimorfismos no DNA de diversos organismos, tratando-se de uma ferramenta rápida, simples e segura (Ferreira & Grattapaglia 1998). Isso facilitou o desenvolvimento das técnicas de sequenciamento automático do DNA, e por consequência, dos estudos baseados em sequências de DNA (SEIFERT, 2009; NILSSON, *et al.*, 2008). A importância desse método é facilmente percebida pelo volume crescente de sequências de DNA depositadas nos bancos de dados obtidas a partir do estabelecimento dessa técnica (BEGEROW, *et al.*, 2010; HIBBETT *et al.*, 2011).

Para fungos, passava a ser possível a amplificação de determinados trechos de DNA a partir de uma quantidade mínima de material biológico, de esporos únicos e, em alguns casos, de material herborizado (BRUNS *et al.*, 1990; GÓES-NETO *et al.*, 2005). Essa possibilidade de gerar grandes quantidades de fragmentos específicos de DNA genômico a partir de amostras escassas foi um dos aspectos fundamentais da revolução causada pela PCR na micologia (FUNGARO, 2000).

Além da PCR, outro marco importante nos estudos moleculares em fungos foi a publicação do pioneiro trabalho de White *et al.*, (1990), no qual os autores descreveram uma lista de oligonucleotídeos e os parâmetros (programas térmicos e concentração dos reagentes) a serem utilizados para amplificação e sequenciamento de DNA nuclear ribossomal e DNA mitocondrial, sendo uma das primeiras aplicações da PCR na micologia. A importância dessa publicação é evidenciada pelas mais de 10.000 citações que esse artigo possui (BLACKWELL, 2013). A partir disso, inúmeros estudos foram publicados relacionados à análise molecular de fungos, sendo estas regiões do DNA bastante utilizadas até hoje (FUNGARO, 2000; SCHOCH, *et al.*, 2012).

Os RNAs ribossômicos (rRNAs), componentes essenciais na fisiologia celular, são o grupo de genes mais utilizado em estudos filogenéticos em fungos (NILSSON *et al.*, 2008; SEIFERT, 2009; SCHOCH *et al.*, 2012; BALASUNDARAM *et al.*, 2015). Esses componentes interagem de modo específico com as proteínas ribossômicas para formar as subunidades dos ribossomos que atuam na síntese de proteínas. Os rRNAs são o principal

produto da transcrição em qualquer célula, constituindo geralmente 80 a 90% da massa de RNA total dos procariotos e eucariotos (GORAB, 2012).

O DNA que sintetiza o RNA ribossômico apresenta-se como um agregado gênico composto pelas subunidades 18S/SSU, 5.8S e 28S/LSU (Figura 1), que aparecem centenas de vezes repetidos no genoma fúngico e organizadas *in tandem* (em sequência), permitindo que sejam amplificados e sequenciados com relativa facilidade se o produto da extração do DNA for de boa qualidade. Estas subunidades são separadas por regiões denominadas ITS1 e ITS2. Todas essas regiões são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico maduro. Por esse agrupamento apresentar regiões altamente conservadas e outras variáveis, é possível analisar a variabilidade em diferentes níveis taxonômicos (JAMES *et al.*, 2006; LARSSON *et al.*, 2006; HIBBETT *et al.*, 2007; SCHOCH *et al.*, 2012; BALASUNDARAM *et al.*, 2015).

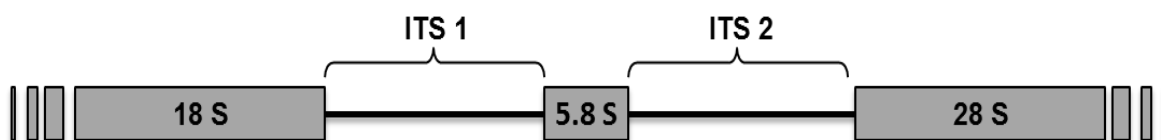


Figura 1. Representação esquemática da unidade de repetição de rDNA dos eucariotos, composto pelo genes 18S/SSU, 5.8S e o gene 28S/LSU espaçados pelas regiões ITS 1 e 2 (Begerow *et al.*, 2009).

A região 18S ou SSU (*Small Subunit*), por exemplo, é a mais conservada e, por isso, é utilizada na comparação de organismos distantemente relacionados, como aqueles pertencentes a ordens e famílias distintas (JAMES *et al.*, 2006; LARSSON *et al.*, 2006; HIBBETT *et al.*, 2007). A porção 28S ou LSU (*Large Subunit*) é mais variável e, portanto, apropriada para a comparação entre gêneros e até mesmo espécies (WAGNER & FISCHER, 2001, 2002a, b; YOMBIYENI *et al.*, 2010; HE & daí, 2012; PARMASTO *et al.*, 2014). As regiões ITS evoluem rapidamente e possuem alta variação interespecífica (em alguns casos também intra-específicas), sendo apropriadas para discriminar espécies proximamente relacionadas ou variedades de uma mesma espécie (NILSSON *et al.*, 2008; SEIFERT, 2009; SINGER & HAJIBABAEI, 2009; BEGEROW *et al.*, 2010; HIBBETT *et al.*, 2011).

No entanto, com a utilização crescente de estudos com sequências de DNA, recursos computacionais para armazenamento, organização e interpretação dos resultados tornaram-se uma etapa urgente a ser desenvolvida, culminando no estabelecimento e aprimoramento da Bioinformática. Essa nova ciência envolve diversas áreas do

conhecimento, tais como a engenharia de *softwares*, matemática, estatística e biologia molecular (MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2012).

A utilização de “DNA *barcoding*” (Código de Barras de DNA) para determinação (identificação) de indivíduos favoreceu ao uso de sequências de DNA como ferramenta auxiliar à taxonomia tradicional. Este termo foi utilizado pela primeira vez na taxonomia em 1993 por Arnot *et al.*, (1993) que discutiram a possibilidade de diferenciar isolados do protozoário *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária, a partir de um único gene.

A ideia inicial era a de se encontrar um único segmento de DNA que fosse útil na identificação de todos os organismos vivos dos mais diferentes Reinos (PEČNIKAR & BUZAN, 2013). Desse modo, sequências de DNA auxiliariam na identificação das espécies de maneira análoga a um código de barras que identifica e distingue produtos comerciais (HAJIBABAEI *et al.*, 2007). No entanto, até hoje se discute qual seria esse único segmento de DNA e, na prática, já se sabe que é pouco provável que de fato exista (PEČNIKAR & BUZAN, 2013). De modo geral, para fungos, como DNA *barcode* destacam-se as regiões ITS (rDNA), mesmo que essas regiões não apresentem resultados satisfatórios e uniformes para os diferentes filos do próprio reino, assim como para os demais reinos. Já para insetos, peixes e pássaros, por exemplo, o Citocromo Oxidase 1 (COX1) é amplamente defendido como *barcode*, sendo esse conceito extrapolado para todo o Reino Animalia (HEBERT *et al.*, 2003, JANZEN *et al.*, 2009). No entanto, para plantas esta região é rica em *introns* derivados de transferências horizontais e de baixo padrão de substituição o que acarreta na obtenção de sequências bastante similares entre espécies de níveis hierárquicos distantemente relacionados, como de famílias diferentes (PEČNIKAR & BUZAN, 2013). Desse modo, para plantas são mais recomendados dois genes encontrados nos cloroplastos: *rbcL* e *matK* (KRESS *et al.*, 2005; CHASE *et al.*, 2007).

A ideia de se identificar os organismos a partir de ferramentas moleculares já era conhecida bem antes da aplicação do DNA *barcoding*, porém utilizando outras técnicas, como aloenzimas, isoenzimas, RAPD e RFLP, que não envolviam o sequenciamento do DNA (SOLFERINI & SCHEEPMAKER, 2010; PEČNIKAR & BUZAN, 2013).

Em estudos taxonômicos, o DNA *barcode* selecionado poderia ser utilizado não apenas para a identificação de espécies conhecidas como também para facilitar a identificação de espécies novas (GÓES-NETO, 2007). Desse modo, um código de barras

ideal deveria ter as seguintes características: (1) Os nucleotídeos do fragmento do trecho do DNA selecionado deveriam ser praticamente idênticos para espécimes da mesma espécie, porém mais variável entre indivíduos de espécies diferentes e (2) a região a ser analisada deveria ser de fácil amplificação, sequenciamento e alinhamento em programas de bioinformática (GÓES-NETO, 2007; PEČNIKAR & BUZAN, 2013).

Como as descrições de espécies novas muitas vezes são baseadas em espécimes antigos mantidos em coleções (herbários), é igualmente incentivado que o código de barras de DNA seja aplicado também a espécimes-tipo, para assim poder-se tirar proveito de coletas de centenas de anos (PUILLANDRE *et al.*, 2012; PEČNIKAR & BUZAN, 2013). Essa necessidade levou ao aprimoramento dos protocolos de extração de DNA para obtenção de DNA genômico com o máximo de qualidade, principalmente livres de compostos que possam degradar o DNA a curto/longo prazo (GÓES-NETO *et al.*, 2005; DENTINGER *et al.*, 2010).

Os esforços globais na aplicação do DNA *barcoding* resultaram na formação do *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), cujo banco de dados (*Bar code of Life Database* BOLD), em janeiro de 2013, continha mais de 2,7 milhões de espécimes registrados, com aproximadamente dois milhões de códigos de barras de DNA pertencentes a mais de 170.000 espécies (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007).

A base de dados de DNA *barcoding* para fungos, *The Fungal Barcoding Database*, organizado pelo *International Fungal Working Group* (<http://www.Fungalbarcoding.org>) enumera uma série de regiões do DNA que atualmente poderiam ser utilizadas como DNA *barcode*. As regiões ITS e os Domínios Divergentes D1/D2 da região LSU, ambas pertencentes ao grupo de genes de RNA ribossomais nucleares, estão entre as mais comumente destacadas com esse propósito (PEČNIKAR & BUZAN, 2013). Estas duas regiões são facilmente amplificadas utilizando *primers* universais e protocolos semelhantes. Por isso, a disponibilidade de sequências em bancos genéticos (GenBank/NCBI) dessas regiões é maior, possibilitando a comparação entre espécies de diferentes localidades geográficas, sendo evolutivamente próximas ou não (NILSSON *et al.*, 2008; SEIFERT, 2009; SINGER & HAJIBABAEI, 2009; Begerow *et al.*, 2010; HIBBETT *et al.*, 2011).

Atualmente, as regiões ITS são as popularmente utilizadas em inferências filogenéticas com propósitos taxonômicos e foram consideradas DNA *barcode* padrão para fungos (SEIFERT, 2009; SINGER & HAJIBABAEI, 2009; HIBBETT *et al.*, 2011;

SCHOCH *et al.*, 2012), mesmo essas apresentando algumas limitações, como altas variações intra-específicas (Figura 2), além de apresentarem múltiplas cópias divergentes dessa região para no mesmo espécime (NILSSON *et al.*, 2008).

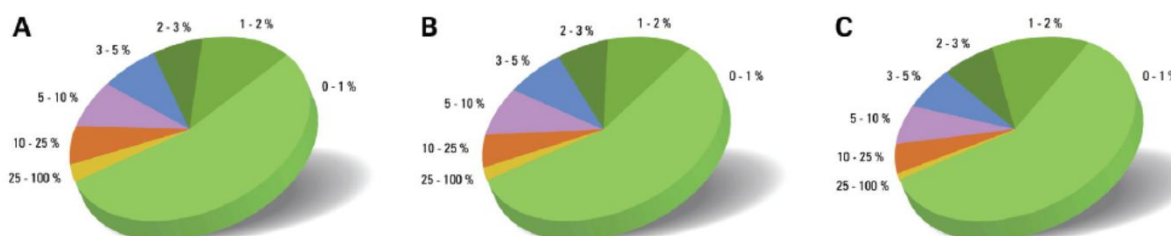


Figura 2. Porcentagem de variabilidade intraespecífica encontrada no Reino Fungi: (A) Região ITS1, (B) Região ITS2, e (C) ITS1-5.8S-ITS2 combinadas (Nilsson *et al.*, 2008).

Contudo, era evidente que somente dados do DNA ribossomal não resolveriam todos os problemas de taxonomia e filogenia dos fungos. Há um consenso de que a comparação de múltiplas filogenias gênicas seria um método mais poderoso para avaliar o limite das espécies. A partir disso, muitos taxonomistas começaram a explorar outros genes, como o SSUmit, além dos que codificam proteínas, como Beta-tubulina, fator de elongação 1 α (TEF), a subunidade maior da RNA polimerase II (RPB1), a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2), MCM7, FG1093 e MS204 (MATHENY *et al.*, 2002; JAMES *et al.*, 2006; SCHOCH *et al.*, 2012; WALKER *et al.*, 2013; VISAGIE *et al.*, 2013).

No entanto, algumas dessas regiões que são menos utilizadas apresentam limitações de ordem prática: não são de fácil amplificação, sequenciamento e alinhamento (Figura 3), além de carecerem de *primers* universais. Por exemplo, para os genes RPB1 e RPB2, em estudos baseados em espécies do mesmo gênero em Agaricomycotina, foram necessárias diferentes combinações de *primers* (mais de quatro) para obtenção de bandas de DNA sem inespecificidades, assim como para obtenção de sequências de qualidade (MATHENY *et al.*, 2002, 2005, 2007).

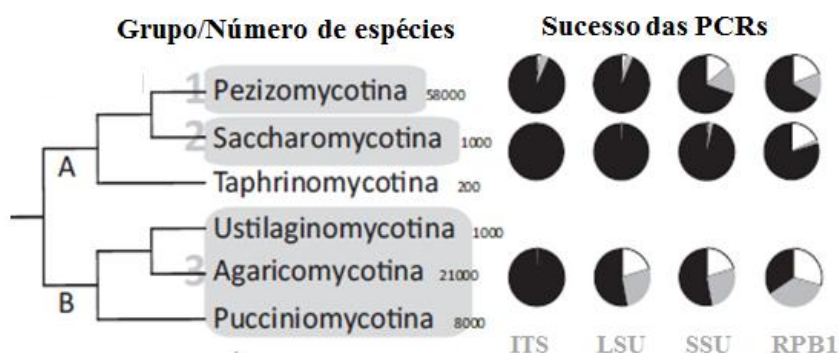


Figura 3. Sucesso de amplificação por PCR e sequenciamento das regiões ITS, LSU, SSU, e RPB1 a partir de espécimes dos filos Ascomycota (A) e Basidiomycota (B). Os gráficos indicam a proporção de sucesso das tentativas de amplificação. Preto: PCRs e sequências obtidas com sucesso; Cinzentos: casos duvidosos (mais de uma banda de DNA amplificada); Branco: PCR sem êxito. (Schoch *et al.*, 2012).

Nos estudos moleculares, essa necessidade de sequenciar e testar diferentes regiões do DNA, em diferentes momentos, permitiu a realização do mais abrangente estudo de filogenia de fungos em nível de reino, realizado por James *et al.*, (2006). Esses pesquisadores utilizaram dados de seis regiões gênicas (SSU rDNA, LSU rDNA, 5.8S rDNA, TEF, RPB1 e RPB2) provenientes de 200 espécies dos principais clados de fungos e motivaram a proposta de classificação filogenética estabelecida por Hibbett *et al.*, (2007), com um sistema de classificação no qual o reino Fungi estaria subdividido em sete filos: Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia e Neocallimastigomycota.

O pequeno número de sequências de nucleotídeos existente nos bancos de dados moleculares, especialmente referentes a táxons de áreas neotropicais, é um fator limitante para estudos filogenéticos de muitos grupos fúngicos, como Hymenochaetaceae, embora tenha ocorrido um considerável crescimento nos últimos anos (HIBBETT *et al.*, 2011; HE & DAI, 2012; INSUMRAN *et al.*, 2012; AMALFI *et al.*, 2013; PARMASTO *et al.*, 2014; TIAN *et al.*, 2013; BALTAZAR *et al.*, 2014).

Segundo Begerow *et al.*, (2010), até 2009 existiam cerca de um milhão de sequências fúngicas depositadas no GenBank/NCBI, e destas, cerca de 147 mil eram sequências das regiões ITS rDNA. Em 2012, esse número já passava de 172 mil (SCHOCH *et al.*, 2012). Atualmente, estima-se que a quantidade de sequências no Genbank/NCBI vem dobrando a cada 18 meses (TAYLOR *et al.*, 2014).

A taxonomia tem como principal objetivo definir os grupos de organismos biológicos segundo caracteres comuns, bem como nomeá-los, refletindo uma classificação natural dos táxons, e nessa perspectiva, dados moleculares oferecem um conjunto de informações que facilitam decisões taxonômicas. As sequências de DNA estão sendo também cada vez mais utilizadas para descrições de espécies novas, principalmente se comparadas ao início da década passada (Figura 4) (SEIFERT, 2009; TAUTZ *et al.*, 2000).

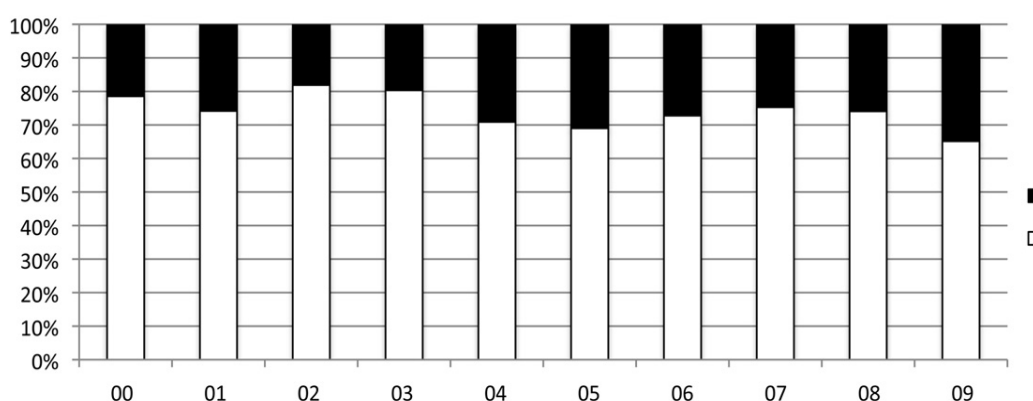


Figura 4. Percentual de novas espécies de fungos registradas no Index Fungorum de 2000 a 2009, incluindo aqueles com (preto) e sem (branco) sequências de DNA depositadas no GenBank (Hibbett *et al.*, 2011).

No entanto, pela estimativa mais recente, o Reino Fungi inclui 5,1 milhões de espécies (Blackwell 2011). Considerando que até o momento foram descritas pouco menos de 100.000 espécies (KIRK, 2008), o conhecimento atual corresponderia a menos de 2% da diversidade do grupo e uma porcentagem ainda menor de espécies possui algum trecho de seu DNA sequenciado e disponível nos bancos de dados moleculares (BEGEROW *et al.*, 2010).

Não restam dúvidas de que esse baixo número de sequências de nucleotídeos, especialmente relativas a espécies tropicais, é um fator limitante para o entendimento das relações filogenéticas dos fungos, assim como diferenciações e caracterizações de espécies (BENGEROW *et al.*, 2010).

O conceito de filogenia surgiu ainda com Charles Darwin e esse tipo de abordagem tem como objetivo analisar relações de ancestralidade a fim de permitir discussões a cerca da história evolutiva dos táxons em análise (FELSENSTEIN, 2004; AMORIM, 2002). Com a filogenia molecular, tornou-se possível o estudo das relações evolutivas entre espécies, permitindo até estimar o tempo de divergência entre os grupos e associá-los com

eventos geológicos históricos (GEML *et al.*, 2008; HALLING *et al.*, 2008; MONCALVO & BUCHANAN, 2008).

Inicialmente utilizada em estudos de relações hierárquicas, a filogenética teve seu conceito ampliado, sendo atualmente utilizada com inúmeros objetivos, tais como: (1) proposição de novos grupos taxonômicos; (2) reconstruções filogenéticas de organismos com base em representantes de diferentes áreas geográficas e relacionando-os com eventos vicariantes; (3) permitir a compreensão da dinâmica de populações (SCHNEIDER, 2007).

Em reconstruções filogenéticas com propósitos taxonômicos, a amostragem é fundamental quando não é possível acessar a totalidade de um universo amostral ou população. É interessante que seja utilizado um conjunto de amostras que represente os principais clados do grupo em estudo, abrangendo, quando possível, uma boa parte da diversidade ecológica e morfológica (GÓES-NETO, 2007). Além disso, é igualmente interessante que os táxons analisados sejam coletados em diferentes áreas geográficas, cobrindo as principais áreas de ocorrência das espécies na natureza (GÓES-NETO, 2007). Nessa perspectiva, muitas reconstruções filogenéticas inadvertidamente passaram a abordar questões elementares de filogeografia (HALLING *et al.*, 2008).

Estudos filogenéticos com propósitos taxonômicos em Hymenochaetaceae com base em espécimes neotropicais são escassos e, portanto, maiores esforços são necessários para a correta reconstrução filogenética do grupo e avaliação dos reais limites taxonômicos existentes entre os gêneros e espécies relacionados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Biológico

Inicialmente foram utilizados 110 espécimes de Hymenochaetaceae coletados há pelo menos cinco anos, em diferentes biomas do Brasil (Tabela 1). Durante as coletas, os basidiomas foram retirados do substrato com auxílio de uma faca e acondicionados em sacos de papel, nos quais foram anotados os dados relativos à coleta. Em laboratório ou durante o trabalho de campo, fragmentos dos basidiomas foram retirados das porções mais internas, a fim de evitar a contaminação por microorganismos que estivessem nas porções superficiais, e acondicionados em microtubos de 1,5 mL com sílica para desidratação. Em laboratório, esses tubos foram armazenados em freezer (-20°C) até a extração do DNA.

Tabela 1. Lista dos espécimes de Hymenochaetaceae utilizados no presente estudo e coletados nas seguintes complexos vegetacionais do Brasil: Amazônia: Floresta Nacional (FLONA) de Caxiuanã (Pará), Estação Ecológica (EE) de Cuniã (Rondônia) e Reserva Duck (Manaus); Mata Atlântica: Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Frei Caneca (Pernambuco), Parque Estadual (PE) de Ilha Grande, Parque Nacional (PARNA) da Tijuca e PARNA Itatiaia (Rio de Janeiro); Caatinga: Serra da Jibóia (Bahia), FLONA Araripe-Apodi (Ceará), Reserva Estadual (RE) Mata do Pau-Ferro (Paraíba), PARNA do Catimbau, Mata do Estado e Sítio Carro Quebrado (Pernambuco), PARNA Serra das Confusões (Piauí); Cerrado: PARNA de Brasília (Distrito Federal). CO = Centro-Oeste; NE= Nordeste, NO = Norte, SE = Sudeste e S = Sul.

Espécie	Origem/Região geográfica	Número de coleta ou de depósito no herbário URM
<i>Fuscoporia callimorpha</i> (Lév.) Groposo, Log.-Leite & Góes-Neto	EE Cuniã (N)	URM83001 [como <i>Phellinus gilvus</i> (Schwein.) Pat.]
<i>F. callimorpha</i>	EE Cuniã (N)	URM83003 (como <i>P. gilvus</i>)
<i>F. callimorpha</i>	EE Cuniã (N)	URM83004 (como <i>P. gilvus</i>)
<i>F. callimorpha</i>	RE Mata Pau-Ferro (NE)	URM83698 (como <i>F. gilva</i> (Schwein.) T. Wagner & M. Fisch.)
<i>F. callimorpha</i>	RE Mata Pau-Ferro (NE)	URM84107 (como <i>F. gilva</i>)
<i>F. callimorpha</i>	RE Mata Pau-Ferro (NE)	URM85067 (como <i>P. gilvus</i>)
<i>F. callimorpha</i>	FLONA Caxiuanã (N)	URM87971
<i>F. callimorpha</i>	FLONA Caxiuanã (N)	AS545 (MG)
<i>F. callimorpha</i>	FLONA Caxiuanã (N)	AS486 (MG)
<i>F. callimorpha</i>	Mata do Estado (NE)	JMB62/23 (como <i>F. gilva</i>)

<i>F. callimorpha</i>	Mata do Estado (NE)	JMB71 (como <i>F. gilva</i>)
<i>F. callimorpha</i>	RPPN Frei Caneca (NE)	NM125
<i>F. callimorpha</i>	RPPN Frei Caneca (NE)	NM459 (como <i>F. gilva</i>)
<i>F. callimorpha</i>	PE Ilha Grande (SE)	URM87969 (como <i>F. gilva</i>)
<i>F. callimorpha</i>	PARNA Brasília (CO)	URM87970 (como <i>F. gilva</i>)
<i>F. callimorpha</i>	PARNA Itatiaia (SE)	TBG23 (como <i>F. gilva</i>)
<i>F. gilva</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM83185
<i>F. gilva</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM83187 (como <i>P. gilvus</i>)
<i>F. gilva</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM83957 (como <i>P. gilvus</i>)
<i>F. gilva</i>	PARNA Tijuca (SE)	URM87972 (como <i>P. gilvus</i>)
<i>F. paracallimorpha</i> Lima-Júnior, Lira & Gibertoni, sp. nov.	FLONA Araripe-Apodi (NE)	URM83800 (como <i>P. gilvus</i>)
<i>F. paracallimorpha</i>	FLONA Araripe-Apodi (NE)	URM83798 (como <i>P. gilvus</i>)
<i>F. paracallimorpha</i>	Sítio Carro Quebrado (NE)	URM82508 (como <i>P. gilvus</i>)
<i>F. paracallimorpha</i>	Sítio Carro Quebrado (NE)	URM82510 (como <i>P. gilvus</i>)
<i>F. paracallimorpha</i>	Sítio Carro Quebrado (NE)	URM82511 (como <i>P. gilvus</i>)
<i>F. paracallimorpha</i>	Sítio Carro Quebrado (NE)	CL769 (como <i>F. gilva</i>)
<i>F. paracallimorpha</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM83926 (como <i>P. gilvus</i>)
<i>F. paracallimorpha</i>	Mata do Estado (NE)	JMB11 (como <i>P. gilvus</i>)
<i>F. paracallimorpha</i>	Serra da Jibóia (NE)	URM83624 (as <i>P. gilvus</i>)
<i>F. wahlbergii</i> (Fr.) T. Wagner & M. Fisch.	Serra da Jibóia (NE)	URM83094 [como <i>F. senex</i> (Nees & Mont.) Ghobad-Nejhad]
<i>Fulvifomes nilgheriensis</i> (Mont.) G. Cunn.	FLONA Caxiuanã (N)	AS612
<i>F. merrillii</i> (Murrill) Baltazar & Gibertoni	PNM Porto Velho (N)	URM83117
<i>F. rimosus</i> (Berk.) Fiasson & Niemelä	Fazenda Mosquito, Cabrobó, PE (NE)	URM82478
<i>F. rhytiphloeus</i> (Mont.) Campos-Santana & Robledo	PNM Porto Velho (N)	Gomes-Silva 105
<i>Fomitiporia apiahyna</i> (Speg.) Vlasák & Kout	PARNA Serra das Confusões (NE)	Lira, C.R.S. 898 2012 (como <i>Phellinus</i> sp.)
<i>F. apiahyna</i>	Serra da Jibóia (NE)	URM83431 (como <i>Phellinus piptadeniae</i> (Teixeira))

		Drechsler-Santos & Robledo)
<i>F. neotropica</i> Campos-Santana, Amalfi, R.M. Silveira, Robledo & Decock	RE Mata Pau-Ferro (NE)	URM85649 (como <i>Fulvifomes melleoporus</i> (Murrill) Baltazar & Gibertoni)
<i>F. neotropica</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM83932 (como <i>Phellinus maxonii</i> (Murrill) D.A. Reid)
<i>F. neotropica</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM84127 (como <i>P. maxonii</i>)
<i>Fomitiporia</i> sp.	Serra da Jibóia, Santa Teresinha BA (NE)	TBG50
<i>Fomitiporia</i> sp.	PARNA Brasília (CO)	TBG13
<i>H. crustacea</i> G.A. Escobar	RPPN Frei Caneca (NE)	RC285
<i>H. damicornis</i> (Link) Lév.	PNM Porto Velho (N)	URM82841
<i>H. damicornis</i>	PNM Porto Velho (N)	URM82848
<i>H. damicornis</i>	PNM Porto Velho (N)	URM82998
<i>H. damicornis</i>	PNM Porto Velho (N)	URM82847
<i>H. damicornis</i>	PNM Porto Velho (N)	URM82845
<i>H. damicornis</i>	Serra da Jibóia (NE)	TBG31
<i>H. damicornis</i>	EE Cuniã (N)	URM82779
<i>H. damicornis</i>	EE Cuniã (N)	URM82785
<i>H. damicornis</i>	EE Cuniã (N)	URM82782
<i>H. damicornis</i>	EE Cuniã (N)	URM82781
<i>H. damicornis</i>	EE Cuniã (N)	Gomes-Silva 85
<i>H. damicornis</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM84093
<i>H. damicornis</i>	FLONA Araripe-Apodi (NE)	URM84531
<i>H. damicornis</i>	RE Mata Pau-Ferro (NE)	URM86062
<i>H. damicornis</i>	RE Mata Pau-Ferro (NE)	CL999
<i>H. damicornis</i>	Cidelândia, MA (NE)	AN-MA18
<i>H. iodina</i> (Mont.) Baltazar & Gibertoni	Serra da Jibóia (NE)	URM84117 (como <i>Cyclomyces iodinus</i> (Mont.) Pat.)
<i>H. iodina</i>	EE Cuniã (N)	URM83013 (como <i>C. iodinus</i>)
<i>H. iodina</i>	EE Cuniã (N)	Gomes-Silva 84 (como <i>C. iodinus</i>)
<i>H. iodina</i>	FLONA Amapá (N)	AS1082 (como <i>C. iodinus</i>)
<i>H. iodina</i>	FLONA Caxiuanã (N)	AS654 (como <i>C. iodinus</i>)
<i>H. leonina</i> Berk. & M.A. Curtis	PNM Porto Velho (N)	URM83540
<i>H. luteobadia</i> (Fr.) Höhn. &	PNM Porto Velho (N)	URM83019

Litsch.

<i>H. luteobadia</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM84124
<i>H. luteobadia</i>	PNM Porto Velho (N)	Gomes-Silva 06
<i>H. luteobadia</i>	PARNA Tijuca (SE)	TBG24
<i>H. resupinata</i> (Sw.) Parmasto	RPPN Frei Caneca (NE)	RC211 [como <i>Dichochaete setosa</i> (Sw.) Parmasto]
<i>H. resupinata</i>	RPPN Frei Caneca (NE)	RC189 (como <i>D. setosa</i>)
<i>H. resupinata</i>	RPPN Frei Caneca (NE)	RC406 (como <i>D. setosa</i>)
<i>H. resupinata</i>	RPPN Frei Caneca (NE)	RC479 (como <i>D. setosa</i>)
<i>H. microspora</i> A.L. Welden	RPPN Frei Caneca (NE)	RC312
<i>H. microspora</i>	RPPN Frei Caneca (NE)	RC317
<i>H. rheicolor</i> (Mont.) Lév.	Estrada Maracás (NE)	CL1147
<i>H. rheicolor</i>	Chapada dos Veadeiros (CO)	TBG40
<i>H. rheicolor</i>	Chapada da Diamantina, Andaraí, BA (NE)	TBG14
<i>Phellinotus neoaridus</i> Drechsler-Santos & Robledo	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM83844 (como <i>Phellinus rimosus</i> (Berk.) Pilát)
<i>P. piptadeniae</i> (Teixeira) Drechsler-Santos & Robledo, ined.	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM85038
<i>P. piptadeniae</i>	PARNA Catimbau	URM84510
<i>P. piptadeniae</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM85035 [como <i>P. baccharidis</i> (Pat.) Pat.]
<i>P. piptadeniae</i>	PARNA Tijuca (NE)	TBG17
<i>P. piptadeniae</i>	Sítio Carro Quebrado (NE)	CL04
<i>P. piptadeniae</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM83992
<i>P. piptadeniae</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM84087
<i>P. piptadeniae</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM83654
<i>Phellinus caribaeo-quercicolus</i> Decock & S. Herrera	Floresta Nacional de Caxiuanã (N)	AS 591
<i>P. caribaeo-quercicolus</i>	Floresta Nacional de Caxiuanã (N)	AS 607
<i>Phellinus</i> sp.	Serra das confusões (NE)	Gomes-silva 278
<i>Phellinus</i> sp.	EE Cuniã (N)	Gomes-Silva 57
<i>Phellinus</i> sp.	PNM Porto Velho (N)	Gomes-Silva 100
<i>Phellinus</i> sp.	Reserva Duck (N)	Gomes-Silva 10
<i>Phellinus</i> sp.	Reserva Duck (N)	Gomes-Silva 14
<i>Phellinus</i> sp.	PARNA Tijuca (SE)	TBG17

<i>Phellinus</i> sp.	PARNA Itatiaia (NE)	TBG23
<i>Phellinus</i> sp.	RPPN Frei Caneca (NE)	NM113
<i>Phellinus</i> sp.	RE Mata Pau-Ferro (NE)	CL1007
<i>Phellinus</i> sp.	Rancho Alegre, Araguatins, TO (N)	AN-TO43
<i>Phellinus</i> sp.	Povoado do Ciriaco, Cidelândia, MA (NE)	AN-MA22
<i>Phellinus</i> sp.	FLONA Caxiuanã (N)	2627 (427)
<i>Phellinus</i> sp.	FLONA Caxiuanã (N)	2638 (460)
<i>Phellinus</i> sp.	FLONA Caxiuanã (N)	2710 (591)
<i>Phellinus</i> sp.	FLONA Caxiuanã (N)	2718 (607)
<i>Phellinus</i> sp.	FLONA Caxiuanã (N)	2414 (1007)
<i>Phellinus</i> sp.	FLONA Caxiuanã (N)	2721 (612)
<i>Tropicoporus linteus</i> (Berk. & M.A. Curtis) L.W. Zhou & Y.C. Dai	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM83827 [como <i>Phellinus Fastuosus</i> (Lév.) S. Ahmad]
<i>T. linteus</i>	FLONA Araripe-Apodi (NE)	URM84512 [como <i>P. calcitratus</i> (Berk. & M.A. Curtis) Ryvarden]
<i>T. linteus</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM83993
<i>T. linteus</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM85603(<i>P. baccharidis</i>)
<i>T. linteus</i>	PARNA Serra das Confusões (NE)	URM80103 (como <i>P. calcitratus</i>)

Após remoção dos fragmentos para extração de DNA, os basidiomas foram mantidos em estufa a 45–50 °C por um período de 2–7 dias para secagem (Fidalgo & Bononi 1989).

A identificação dos espécimes foi realizada com auxílio de literatura especializada (RYVARDEN, 2004; BALTAZAR *et al.*, 2009; LÉGER, 1998; HE & DAI, 2012; PARMASTO, 2000; PARMASTO, *et al.*, 2014; HATTORI *et al.*, 2014) a partir de análises macro (forma, coloração, superfície abhimenial/ himenial, contexto, tubos e margem) e microscópicas (sistema hifálico, presença/ausência de estruturas estéreis/férteis e basidiosporos) dos basidiomas. Observações microscópicas foram feitas a partir de cortes à mão livre de cada basidioma, com lâmina de aço inoxidável. Os cortes foram colocados entre lâminas e lamínulas com KOH 5% e floxina 1% (Teixeira 1995) e

separadamente foi utilizado o reagente de Melzer e Azul de Aman (Ryvarden 1991). As cores foram referidas de acordo com Watling (1969).

Para comparação, foram selecionados 58 espécimes herborizados, sendo 41 espécimes de *Hymenochaete* [oito *Hymenochaete damicornis* (URM78943, URM78949, URM81019, URM82998, URM82786, URM78955, URM82840 e URM82999); 15 de *H. iodina* (URM78916, URM78917, URM78919, URM79512, URM79513, URM78918, URM78920, URM78921, URM78925, URM79480, URM79422, URM81119, URM81121, URM81048 e URM83015); seis de *H. leonina* (URM83589, URM83590, URM83591, URM83592, URM83593, URM83594 e URM83540); 12 de *H. luteobadia* (URM 83598, URM83600, URM78957, URM82889, URM81040, URM82853, URM78958, URM78959, URM83021, URM82798 e URM83021); e um de *H. unicolor* (URM83542)]; 15 de *Phellinus* s.l. [sete *Inonotus calcitratus* (URM79357, URM79358, URM79359, URM79360, URM79362, URM83103 e URM83118), um *Fulvifomes membranaceus* (URM79348), oito *F. merrillii* (URM78992, URM78994, URM78993, URM78995, URM79536, URM79534, URM79355 e URM79356); e um *Fomitiporella umbrinella* (URM79350)]. Todas essas amostras foram selecionadas a partir dos estudos morfológicos de Gomes-Silva *et al.*, (2009, 2012, 2013).

3.2. Extração de DNA, amplificação das sequências-alvo e sequenciamento

A extração do DNA genômico dos fragmentos de basidioma dos espécimes frescos foi realizada com base no protocolo CTAB adaptado por Góes-Neto *et al.*, (2005). Fragmentos de tubos e contexto (30 mg) foram macerados manualmente em gral de porcelana com um pistilo com adição de nitrogênio líquido. Posteriormente, em microtubos de 1,5 mL, adicionou-se ao macerado 650 µL de tampão CTAB 2% (Rogers & Bendich 1985) e cada amostra foi incubada a 65°C por 40 min. Em seguida, o extrato foi misturado com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), precipitado em isopropanol (1:1), lavado com 1 mL de etanol 70% por pelo menos duas vezes e, por último, ressuspendido em 40 µL de água ultrapura.

Para as extrações de DNA dos basidiomas de espécimes provenientes do herbário URM, selecionadas de acordo com os trabalhos de Gomes-Silva *et al.*, (2009, 2012, 2013), foi utilizado o *Kit DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN).

As reações de amplificação das regiões ITS1-5.8S-ITS2 (rDNA) foram realizadas em um volume reacional de 50 µL, usando um termociclador TECHNE TC-512, contendo

os seguintes componentes para cada tudo de 0,2 mL: 1x Tampão KAPA master mix, 200 µM dNTPs, 0,4 µM de cada *primer*, 0,4 U/µL de KAPA *Taq* Polimerase e aproximadamente 1 ng/µL de DNA molde. Os *primers* ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') foram utilizados (White *et al.*, 1990). Os parâmetros dos ciclos térmicos basearam-se em Lima-Júnior *et al.*, (2014), com um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento dos *primers* a 58°C por 30 s, e extensão a 72°C por 60s, além de um ciclo de extensão final a 72°C por 2 min.

Para a região LSU, as concentrações dos componentes do *mix* de PCR foram idênticos ao descrito para as regiões ITS, sendo utilizado o par de *primers* LR0R (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') e LR05 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG -3') (White *et al.*, 1990). Os parâmetros dos ciclos térmicos também foram baseados em Lima-Júnior *et al.*, (2014), utilizando um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 1 min 25 s, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 35 s, anelamento dos *primers* a 55°C por 55 s, e extensão a 72°C por 2 min, além de um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min. Controles negativos, contendo todos os componentes exceto DNA, foram utilizados em cada procedimento para detectar possíveis contaminações.

O sucesso dos procedimentos relativos à extração de DNA e às reações de PCR foi observado a partir de 5 µL do produto final desses dois procedimentos corados com 2 µL de *GelRed Nucleic Acid Gel Stain Biotium* (0,5µg/mL), a partir de eletroforese em gel de agarose 1% a 100 Volts por 40 min, e visualizado sob luz UV, sendo o resultado fotodocumentado.

Posteriormente, produtos de amplificação das regiões ITS e LSU (rDNA) foram purificados com o *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific) e encaminhados para sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas da UFPE.

3.3. Alinhamento das sequências e análise filogenética

Os eletroferogramas das regiões ITS e LSU foram analisados separadamente no software Staden Package 2.0 (Staden *et al.*, 1998) e editados no programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). As sequências obtidas foram utilizadas para busca das mais similares depositadas no GenBank/NCBI, empregando a ferramenta BLASTn. As sequências da região ITS e/ou LSU foram alinhadas no ClustalX (LARKIN *et al.*, 2007) e

editadas em conjunto com as recuperadas da base de dados GenBank/NCBI (Tabela 2) também utilizando o programa MEGA6.

Tabela 2. Lista de sequências das regiões ITS e/ou LSU de espécimes de *Hymenochaetaceae* depositadas no GenBank utilizadas neste estudo.

Espécie	Origem Geográfica/ Número de coleta ou de depósito em herbário	Número de acesso no GenBank/NCBI	
		ITS rDNA	LSU rDNA
<i>Arambarria destruens</i> Rajchenb. & Pildain	Argentina / CIEFAPcc192	-	KP347520
<i>A. destruens</i>	Argentina / CIEFAPcc194	-	KP347521
<i>A. destruens</i>	Argentina / CIEFAPcc414	-	KP347522
<i>A. destruens</i>	Argentina / CIEFAPcc347	KP347538	-
<i>Fomitiporella cavicola</i> (Kotl. & Pouzar) T. Wagner & M. Fisch.	UK / (N153) K	-	AY059052
<i>F. umbrinella</i>	USA Georgia / CBS 303.66	-	AY059036
<i>Fomitiporella</i> sp.	LWZ 20130812-1	-	KF729937
<i>Fomitiporella</i> sp.	Oe5 /Nd	JF895466	JQ910908
<i>Fomitiporella</i> sp.	Oe6 / Nd	JF895467	JQ910909
<i>Fomitiporia baccharidis</i> (Pat.) Decock, Robledo & Amalfi	Argentina / MUCL 47756	JQ087886	JQ087913
<i>F. baccharidis</i>	Argentina / MUCL 47757	JQ087887	JQ087914
<i>F. baccharidis</i>	Argentina / MUCL 47758	JQ087888	JQ087915
<i>F. tabaquilio</i> (Urcelay, Robledo & Rajchenb.) Decock & Robledo	Argentina /MUCL 46230	GU461940	DQ122394
<i>F. tabaquilio</i>	Argentina / MUCL 47754	GU461941	GU461994
<i>F. neotropica</i> Campos- Santana, Amalfi, R.M. Silveira, Robledo & Decock	Argentina / MUCL 49549	KF444696	KF444719
<i>F. neotropica</i>	Brasil / MUCL 54246	KF444697	KF444720
<i>F. neotropica</i>	Brasil /MUCL 54206	KF444700	KF444723
<i>F. punctata</i> (Fr.) Murrill	Alemanha / MUCL 34101	GU461947	AY618200
<i>F. robusta</i> (P. Karst.)	-	-	HQ328523

Fiasson & Niemelä			
<i>F. robusta</i>	Alemanha (TW 242) REG		AF311008
<i>F. apiahyna</i> (Speg.) Robledo, Decock & Rajchenb.	Equador / MUCL 51485	GU461962	GU461996
<i>F. apiahyna</i>	Equador / MUCL 51451	GU461963	GU461997
<i>F. apiahyna</i>	Guiana Francesa / MUCL 53042	JX093773	JX093817
<i>Fomitiporia</i> sp.	México / MUCL 53993	JX093807	JX093851
<i>Fomitiporia</i> sp.	México / MUCL 53994	JX093808	JX093852
<i>Fomitiporia</i> sp.	Argentina / CBS 386.66 = MUCL 46181	EF433563	EF429234
<i>Fomitiporia</i> sp.	Guiana Francesa / MUCL 53675	JX093791	JX093835
<i>F. dryophila</i> Murrill	EUA / TJV-93-232 (MUCL 46379)	EF429240	EF429221
<i>F. dryophila</i>	EUA / TJV-93-234 (MUCL 46380)	EF429238	EF429219
<i>F. dryophila</i>	EUA / TJV-93-259 (MUCL 46381)	EF429239	EF429220
<i>F. dryophila</i>	EUA / FP-104030-T (MUCL 51144)	KF444689	KF444712
<i>F. langloisii</i> Murrill	EUA / FP-105-816-T (MUCL 46373)	EF429243	EF429226
<i>F. langloisii</i>	EUA / HHB-9868-Sp (MUCL 46377)	EF429241	EF429224
<i>F. sonora</i> (Gilb.) Y.C. Dai	EUA / RLG-10862-Sp (MUCL 47689)	JQ087893	JQ087920
<i>F. maxonii</i> Murrill	Cuba / MUCL 46017(= CRGF 182)	EF433559	EF429230
<i>F. maxonii</i>	Argentina / MUCL 51331	KF444691	KF444714
<i>F. maxonii</i>	México / MUCL 53364	KF444695	KF444718
<i>Fulvifomes fastuosus</i> (Lév.) Bondartseva & S. Herrera	Tailândia/ LWZ 20140728-29	KR905673	
<i>F. fastuosus</i>	Tailândia/ LWZ 20140729-14	-	KR905666
<i>F. fastuosus</i>	Tailândia/ LWZ 20140729-35	-	KR905667
<i>F. fastuosus</i>	Tailândia / LWZ 20140731-13	KR905674	KR905668
<i>F. fastuosus</i>	Tailândia / LWZ 20140801-1	KR905675	KR905669
<i>F. imbricatus</i> L.W. Zhou	Tailândia / LWZ 20140728-16	KR905670	KR905677

<i>F. imbricatus</i>	Tailândia / LWZ 20140729-26	KR905679	KR905671
<i>F. indicus</i> (Masse) L.W. Zhou	China / O25034	KC879262	KC879259
<i>F. indicus</i>	China / LWZ-2012a voucher Yuan 5938	-	JX866778
<i>F. indicus</i>	China / LWZ-2012a voucher Yuan 5932	KC879261	JX866777
<i>F. indicus</i>	China / O 918100	-	KC879280
<i>F. thailandicus</i> L.W. Zhou	Tailândia /LWZ 20140731-1	KR905672	KR905665
<i>F. kawakamii</i> (M.J. Larsen, Lombard & Hodges) T. Wagner & M. Fisch.	EUA Havai/ CBS 428.86	-	AY059028
<i>F. nilgheriensis</i> (Mont.) Bondartseva & S. Herrera	Flórida EUA/ CBS 209.36	AY558633	AY059023
<i>F. siamensis</i> T. Hattori, Sakayaroj & E.G.B. Jones	SP-2012b strain XG2	JX104709	JX104756
<i>F. xylocarpicola</i> T. Hattori, Sakayaroj & E.G.B. Jones	SP-2012c strain MU8	JX104676	JX104723
<i>F. robiniae</i> (Murrill) Murrill	EUA / CBS 211.36)	AY558646	AY059038
<i>F. halophilus</i> T. Hatt., Sakay. & E.B.G. Jones	SP-2012a strain XG4	JX104705	JX104752
<i>Aurificaria luteoumbrina</i> (Romell) D.A. Reid	Porto Rico / LF 39116	-	AY059033
<i>Inonotus porrectus</i> Murrill	EUA / CBS 296.56	AY558603	AY059051
<i>Fuscoporia callimorpha</i>	JV090487 / Flórida, EUA	JF692190	-
<i>F. callimorpha</i>	JV090487 / Flórida, EUA	JF692191	-
<i>F. callimorpha</i>	JV0312205 / Flórida, EUA	JF692192	-
<i>F. callimorpha</i>	JV040914 / Ilhas Virgens, EUA	JF692193	-
<i>F. ferrea</i> (Pers.) G. Cunn.	CBS 444.48 / Canadá	AY558617	-
<i>F. ferrea</i>	D4-3B-b / Canadá	DQ516525	-
<i>F. ferrea</i>	MUCL45984 / Nd	-	DQ122398
<i>F. ferruginosa</i> (Schröd.) Murrill	KCTC6652 / Índia	AY558616	-
<i>F. ferruginosa</i>	KCTC6652 / Índia	AY189700	-
<i>F. ferruginosa</i>	MF82-930 / Alemanha	-	AF311032
<i>F. ferruginosa</i>	MUCL45983 / Europa	-	DQ122397
<i>F. ferruginosa</i>	DLL2009-157 / EUA	-	JQ673213
<i>F. ferruginosa</i>	DLL2009-148 / EUA	-	JQ673211

<i>F. ferruginosa</i>	DLL2009-173 / EUA	-	JQ673214
<i>F. formosana</i> (T.T. Chang & W.N. Chou) T. Wagner & M. Fisch.	Nd / Taiwan	-	AY059034
<i>F. gilva</i>	Nd / Nepal	AB811862	-
<i>F. gilva</i> (como <i>P. gilvus</i>)	ATCC26729 / Nd	AF250932	-
<i>F. gilva</i>	SP20 / Califórnia-EUA	AM269796	-
<i>F. gilva</i>	SP18 / Califórnia-EUA	AM269795	-
<i>F. gilva</i>	KCTC6653 / Coreia do Sul	AY558620	-
<i>F. gilva</i>	Nd / China	FJ481039	-
<i>F. gilva</i>	MSU395 / Tailândia	JF461324	-
<i>F. gilva</i>	MSU739 / Tailândia	JF461325	-
<i>F. gilva</i>	MSU650 / Tailândia	JF461326	-
<i>F. gilva</i>	MSU653 / Tailândia	JF461327	-
<i>F. gilva</i>	MSU30 / Tailândia	JF461328	-
<i>F. gilva</i>	MSU549 / Tailândia	JF461329	-
<i>F. gilva</i>	Nd / China	JN182910	-
<i>F. gilva</i>	HE21025 / China	KC505569	-
<i>F. gilva</i>	CFMR DLL2011-109 / Wisconsin, EUA	KJ140621	-
<i>F. gilva</i>	CFMR DLL2011-147 / Wisconsin, EUA	KJ140647	-
<i>F. gilva</i> (como <i>Phellinus gilvus</i>)	MF 91-42e / EUA	-	AY059025
<i>F. gilva</i>	FPL5528 / China	-	AF334925
<i>F. gilva</i>	FPL5528 / Nd	-	AF518636
<i>F. gilva</i>	Nd / China	-	HQ328525
<i>F. gilva</i>	40471 / Taiwan	-	JX484006
<i>F. montana</i> Y.C. Dai & Niemelä	Zhang 34 / China	-	AY059053
<i>F. montana</i>	Nd / Taiwan	JX484015	JX484007
<i>F. rhabarbarina</i> (Berk.) Groposo, Log.-Leite & Góes-Neto (como <i>P. rhabarbarinus</i>)	Cui6464 / China	JQ780413	JQ797671
<i>F. rhabarbarina</i> (como <i>P. rhabarbarinus</i>)	Nd / China	-	HQ328526
<i>F. rhabarbarina</i> (como <i>P. rhabarbarinus</i>)	Nd / Taiwan	-	JX484008
<i>F. senex</i> (Nees & Mont.) Ghobad-Nejhad (como <i>P. senex</i>)	CBS442.76 / Índia	AY558647	-

<i>F. senex</i>	Nd / China	KC414230	-
<i>F. senex</i>	MEL2382630 / Austrália	KP012992	KP012992
<i>F. senex</i>	KUC2011092- 2013 / Coréia	JX463658	JX463658
<i>F. senex</i>	MUCL 46182 / Bélgica	-	HM635680
<i>Fuscoporia</i> sp.	MEL2382669 / Austrália	KP013032	-
<i>Fuscoporia</i> sp.	MUCL44810 / Etiópia	-	AY618208
<i>F. torulosa</i> (Pers.) T. Wagner & M. Fisch.	Nd / Japão	AB811863	-
<i>F. torulosa</i>	Nd / Japão	AB811864	-
<i>F. torulosa</i>	CBS182.34 / EUA	AY558649	-
<i>F. torulosa</i>	Nd / República Tcheca	AM269803	-
<i>F. torulosa</i>	Pt1 / República Tcheca	EF068234	-
<i>F. torulosa</i>	MSU618 / Tailândia	JF461320	-
<i>F. torulosa</i>	MSU451 / Tailândia	JF461321	-
<i>F. torulosa</i>	MSU380 / Tailândia	JF461322	-
<i>F. torulosa</i>	MSU558 / Tailândia	JF461323	-
<i>F. torulosa</i> (como <i>Phellinus torulosus</i>)	Pt 4 / França	-	AF311041
<i>F. torulosa</i>	MUCL45967 / França	-	HM635681
<i>F. torulosa</i>	Nd / Taiwan	-	JX484009
<i>F. insolita</i> Spirin, Vlasák & Niemelä	SP5251 / Rússia	KJ677113	-
<i>F. insolita</i>	SP5241 / Rússia	KJ677114	-
<i>F. insolita</i>	SP5208 / Rússia	KJ677116	-
<i>F. wahlbergii</i>	MF89-992 / Ilhas Canárias	-	AF311045
<i>F. viticola</i> (Schwein.) Murrill	MF84-59 / Alemanha	-	AF311044
<i>F. viticola</i>	GEL4100 / Nd	-	AJ406470
<i>F. viticola</i>	CBS381.82 / Nd	-	AY558715
<i>F. viticola</i>	AFTOL-ID977 / Nd	-	AY885166
<i>Inocutis dryophila</i> (Berk.) Fiasson & Niemelä	França / MF 87-918 REG	-	AF311012
<i>I. rheades</i> (Pers.) Fiasson & Niemelä	Alemanha / TW 385 REG	-	AF311019
<i>I. tamaricis</i> (Pat.) Fiasson & Niemelä	Itália / MF 96-415 REG	-	AF311021
<i>Inonotus hispidus</i> (Bull.) P. Karst.	Alemanha / MF 92-829) REG	-	AF311014
<i>Inonotus hispidus</i>	Nd / FP-106082	AM269784	AM269848
<i>I. ulmicola</i> Corfixen	Dinamarca / PC 4072 O	-	AY059042

<i>I. obliquus</i> (Ach. ex Pers.) Pilát	Alemanha / TW 705 REG	-	AF311017
<i>Hymenochaete acanthophysata</i> J.C. Léger	CBS 925.26	-	AF385144
<i>H. cruenta</i> (Pers.) Donk	He766	JQ279595	JQ279681
<i>H. cyclolamellata</i> T. Wagner & M. Fisch.	Cui7393	JQ279513	JQ279629
<i>H. duportii</i> (Pat.) T. Wagner & M. Fisch.	AFTOL-ID 666	DQ404386	AY635770
<i>H. floridea</i> Berk. & Broome	He536	JQ279597	JQ279683
<i>H. hydnoidea</i> T. Wagner & M. Fisch.	He245	JQ279590	JQ279680
<i>H. murina</i> Bres.	He569	JQ716406	JQ716412
<i>H. paucisetigera</i> (Parmasto & Sheng H. Wu) S.H. He & Y.C. Dai	Cui7845	JQ279644	JQ279560
<i>H. peroxydata</i> (Berk. ex Cooke) Baltazar, Gorjón & Rajchenb.	J.M. Baltazar 1819	KF371644	KF371647
<i>H. peroxydata</i>	J.M. Baltazar 2056, CIEFAPcc 409	KF371645	KF371648
<i>H. peroxydata</i>	J.M. Baltazar 2102, CIEFAPcc 411	KF371646	KF371649
<i>Hymenochaete rheicolor</i> (Mont.) Lév.	He503	JQ279530	JQ279632
<i>Hymenochaete rubiginosa</i> (Dicks.) Lév.	He1049	JQ716407	JQ279667
<i>Hymenochaete sphaericola</i> Lloyd	He303	JQ279599	JQ279684
<i>Hymenochaete xerantica</i> (Berk.) S.H. He & Y.C. Dai	Cui9209	JQ279519	JQ279635
<i>I. pachyphloeus</i> (Pat.) T. Wagner & M. Fisch.	Índia / CBS 446.76	-	AY059020
<i>I. pegleri</i> Ryvarden	Zimbabwe (LR 32469) O	-	AY059049
<i>I. plorans</i> (Pat.) Bondartsev & Singer	Morocco / S. Plank 13.4.82 O	-	AY059046
<i>I. rodwayi</i> D.A. Reid	Papua Nova Guiné / 97/182 O	-	AY059047
<i>I. nidus-pici</i> Pilát	Hungria / CBS 475.72	-	AF311015
<i>Mensularia radiata</i> (Sowerby) Lázaro Ibiza	Alemanha / TW 704 REG	-	AF311018
<i>Phellinus caribaeo-querzicolus</i> Decock & S. Herrera	Cuba / MUCL 46003	HM635697	DQ127279
<i>P. crustosus</i> (Speg.) A.M. Gottlieb, J.E. Wright & Moncalvo	CIEFAPcc199	KP347540	KP347526

<i>Phellinus crustosus</i>	CIEFAPcc277	KP347541	KP347527
<i>P. laevigatus</i> (P. Karst.) Bourdote & Galzin	Nd	-	HQ328534
<i>P. igniarius</i> (L.) Quél.	Alemanha / MF 83- 1110a REG	-	AF311033
<i>P. tuberculosus</i> Niemelä	Alemanha (TW 114) REG	-	AF311043
<i>Phellinotus neoarida</i> Drechsler-Santos, Robledo & Rajchenb	Brasil / URM80762	Drechsler <i>et al.</i> , (2016)	Drechsler <i>et al.</i> , (2016)
<i>P. neoarida</i>	Brasil / URM80764	Drechsler <i>et al.</i> , (2016)	Drechsler <i>et al.</i> , (2016)
<i>P. piptadeniae</i> Teixeira	Brasil / URM80345	Drechsler <i>et al.</i> , (2016)	Drechsler <i>et al.</i> , (2016)
<i>Phellinus tremulae</i> (Bondartsev) Bondartsev & P.N. Borisov	MSNU32028 / Coreia	AF200240	-
<i>Phellinus linteus</i>	Nd	AF080457	-
<i>Phylloporia ribis</i> (Schumacher.) Ryvarden	Alemanha/ MF 82-828	-	AF311040
<i>P. ribis</i>		AF200237	-
<i>P. bibulosa</i> (Lloyd) Ryvarden	Pakistan (Ahmad 27088) O	-	AF411824
<i>P. pectinata</i> (Klotzsch) Ryvarden	Kurrajong/New South Wales (R. Coveny 113) O	-	AF411823
<i>P. spathulata</i> (Hook.) Ryvarden	Mexico/ Chay 456 O	-	AF411822
<i>Sanguangporus</i> <i>lonicericola</i> (Parmasto) L.W. Zhou & Y.C. Dai	China / Dai 8376 (BJFC)	-	KP030772
<i>S. sanghuang</i> (Sheng H. Wu, T. Hatt. & Y.C. Dai) Sheng H. Wu, L.W. Zhou & Y.C. Dai	China/Wu 0903-2 (TNM)	-	KP030773
<i>S. baumii</i> (Pilát) L.W. Zhou & Y.C. Dai	Russia (TAA 82-20) TAA	-	AY059058
<i>P. vaninii</i> (Ljub.) L.W. Zhou & Y.C. Dai	China (Dai 1980) REG	-	AY059056
<i>S. weirianus</i> (Bres.) L.W. Zhou & Y.C. Dai	USA Arizona (CBS 618.89)	AY558654	AY059035
<i>Tropicoporus linteus</i>	EUA Flórida / JV 0904- 64	-	JX467701
<i>Tropicoporus linteus</i>	EUA Flórida / JV 0904- 140	-	KP030780
<i>Pseudochaete corrugata</i> (Fr.) S.H. He & Y.C. Dai	He761	JQ279606	JQ279621

<i>Pseudochaete lamellata</i> (Y.C. Dai & Niemelä) S.H. He & Y.C. Dai	Cui7629	JQ279603	JQ279617
<i>P. tabacina</i> (Sowerby) T. Wagner & M. Fisch.	He810	JQ279611	JQ279626
<i>P. tabacinoides</i> (Yasuda) S.H. He & Y.C. Dai	Cui10428	JQ279604	JQ279618
Uncultured fungus	L04288-112-2061-A12 / Alemanha	GU054028	-
Uncultured fungus	CMH166 / Kansas – EUA	KF800257	-
Uncultured fungus	rcw57 / EUA	KM103993	-
OUTGROUP			
<i>Antrodia carbonica</i>	Wilcox-96	KC585242	KC585064
<i>Fomes fomentarius</i>	DAOM129034	JX183713	AF261538

Nd: não disponível

As árvores filogenéticas foram construídas a partir de método de máxima parcimônia (MP) e/ou de máxima verossimilhança (MV), com 5000 reamostragens de *bootstrap* utilizando o programa PAUP versão 4 (Swofford 2002) e MEGA6, respectivamente. Para as análises pelo método de Máxima Verossimilhança (MV) foram utilizadas os parâmetros obtidos pelo jModelTest (Darriba *et al.*, 2012). Para todas as reconstruções filogenéticas, também foi realizada uma inferência bayesiana (1×10^6 gerações) com o programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist *et al.*, 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração do DNA Genômico e Amplificações das Regiões-Alvo

A partir dos 110 fragmentos de basidiomas provenientes de coletas recentes e que se encontravam armazenados em *freezer*, foi obtido DNA de boa qualidade com bandas de DNA íntegro e de alto peso molecular (cerca de 20.000 pb) de 90 amostras. O produto das extrações do DNA da maioria delas apresentou-se pigmentado (levemente amarelada), porém translúcido, exceto para três amostras de *Fomitiporia* sp. (CL898, TBG13 e TBG50), *Fuscoporia wahlbergii* (URM83094) e todas as amostras de *Phellinus* e *Phellinotus*, que apresentaram coloração amarronzada.

Das 58 amostras herborizadas selecionadas, apenas em 16 foram visualizadas bandas de DNA, porém de baixo a médio peso molecular (100 a 700 pb), sendo 14 espécimes de *Hymenochaete* [quatro *H. damicornis* (URM82998, URM82786, URM82840 e URM82999), quatro de *H. iodina* (URM79480, URM81121, URM81048 e URM83015); três de *H. leonina* (URM83540 e URM83591); três de *H. luteobadia* (URM83598, URM83600 e URM83021)]; dois de *Fulvifomes merrillii* (URM79355 e URM79356); e um de *Inonotus calcitratus* (URM83103 e URM83118). Nas demais amostras, não foi possível a obtenção de DNA genômico. A experiência tem demonstrado que para a realização de estudos moleculares a utilização de material fresco (basidioma recém-coletado ou cultivo) é o ideal (FERES *et al.*, 2005; GÓES-NETO *et al.*, 2005). Como os fragmentos de basidiomas utilizados para extração de DNA foram retirados de amostras depositados no herbário URM há pelo menos cinco anos, a obtenção de DNA genômico desses exemplares foi comprometida.

Do total de amostras herborizadas, 15 espécimes de *Phellinus* e os dois de *Inonotus* apresentaram extratos de DNA fortemente pigmentados. Góes-Neto *et al.*, (2005) obtiveram resultados semelhantes utilizando amostras herborizadas dos mesmos gêneros.

Para todas as amostras que apresentaram bandas de alto peso molecular, os extratos, mesmo pigmentados, tiveram as regiões ITS e LSU (rDNA) amplificadas com sucesso, exceto três amostras de *Fomitiporia* sp. (CL898, TBG13 e TBG50), das quais foram obtidas apenas amplificações da região LSU. Nessas amostras, os compostos responsáveis pela pigmentação escura dos extratos aparentemente afetaram as reações de PCR para a região ITS. Pigmentos resultantes da presença de polissacarídeos e compostos

fenólicos podem resultar na degradação do DNA genômico (ROGERS, 1994; GÓES-NETO *et al.*, 2005) e/ou inibição da ação da *Taq* polimerase (FUNGARO, 2000).

De modo geral, para o sucesso das amplificações das sequências-alvo por PCR, foram necessárias diluições dos extratos originais que variaram de 10^{-1} a 10^{-3} . Este resultado está de acordo com relatos da literatura cujos trabalhos utilizaram protocolos de extração de DNA semelhantes (WAGNER & FISCHER, 2002a; GÓES-NETO *et al.*, 2005). Das amostras herborizadas, apenas três tiveram as regiões ITS e LSU amplificadas com sucesso sem necessidade de diluição (*Inonotus calcitratus* URM83103, *Hymenochaete iodina* URM83015 e *H. leonina* URM83540).

A amplificação do locus ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA utilizando os *primers* ribossomais ITS4 e ITS5 gerou um fragmento de aproximadamente 700 pb para todas as amostras, enquanto para a região LSU, com os *primers* LR0R e LR5, observaram-se fragmentos de 800 pb. Para ambas as regiões não foi possível detectar diferenças intraespecíficas em relação ao tamanho das bandas de DNA.

4.2. Taxonomia Molecular de Hymenochaetaceae

A matriz de sequências de Hymenochaetaceae relativas à região LSU foi composta por 191 sequências, incluindo as 90 geradas para o presente estudo. Todas as sequências foram alinhadas em conjunto com uma de *Fomes fomentarius* (AF261538) e uma de *Antrodia carbonica* (KC585064) utilizadas como grupo externo. A matriz final apresentou 819 posições no alinhamento. Dessas, 671 representaram sítios conservados (53%) e 559 caracteres variáveis (47%), dos quais 479 foram informativos para parcimônia (38%).

Adicionalmente, foi realizada uma análise concatenada das sequências LSU e ITS com os gêneros da família cujos espécimes foram possíveis sequenciar ambas as regiões. Para essa análise, foram utilizadas sequências de 83 espécimes, dos quais 33 foram geradas no presente estudo. O alinhamento final apresentou 1217 posições com 445 caracteres invariáveis (54%) e 365 caracteres variáveis (46%). Destes, 294 foram parcimoniosos informativos (24%). No entanto, nessa análise combinada, não foram inseridos todos os representantes de *Fuscoporia* e *Hymenochaete*, gêneros com maior representação no banco de dados (GenBank/NCBI), assim como maior número de

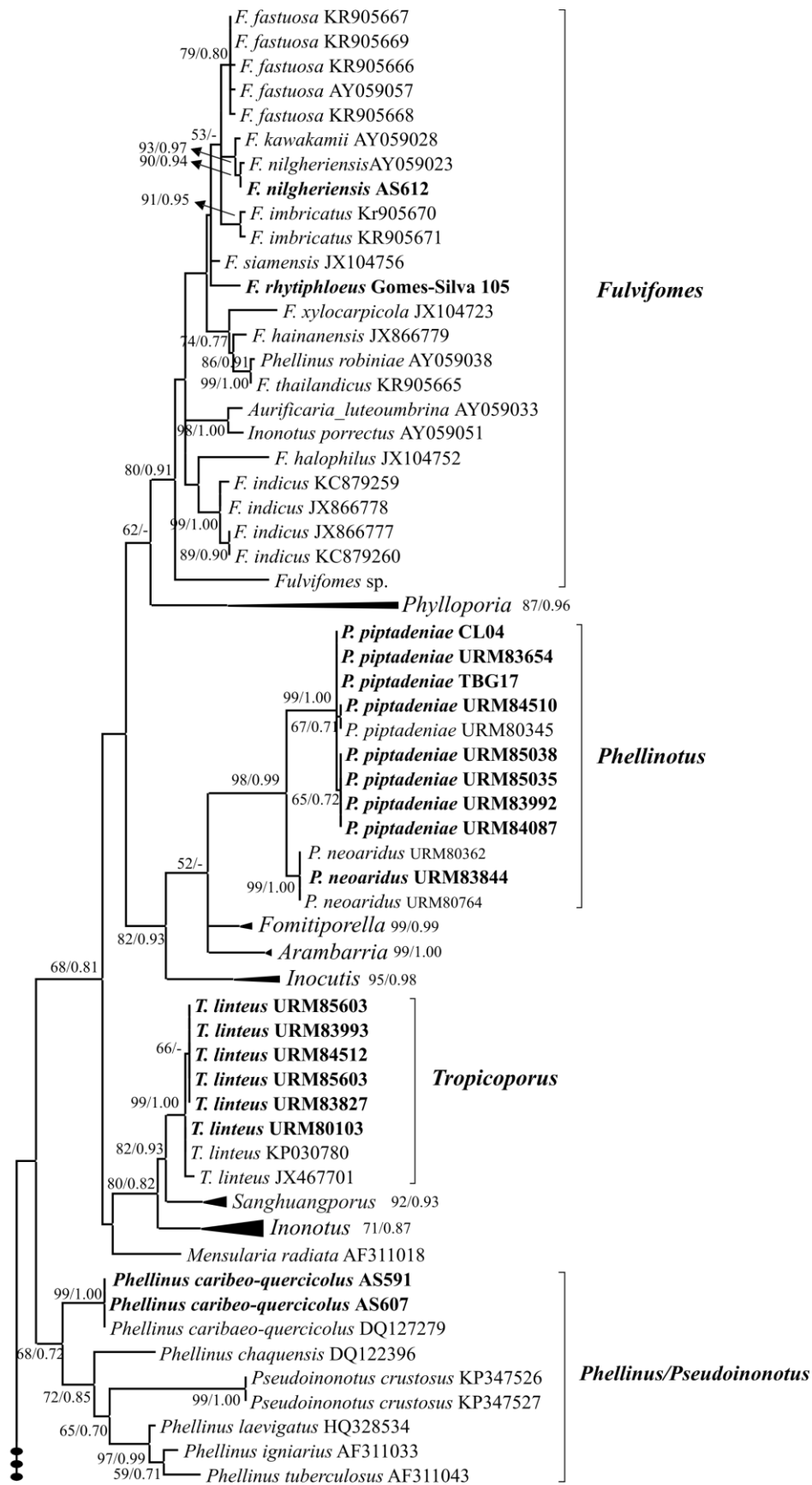
sequências disponibilizadas no presente estudo (30 e 35 sequências, respectivamente). Desse modo, esses gêneros foram analisados separadamente.

A matriz com 83 sequências ITS de *Fuscoporia* (30 obtidas no presente estudo) apresentou 391 sítios, sendo 187 conservados (47%) e 204 variáveis (52%), dos quais 175 (44%) foram parcimoniosos informativos. Para a análise baseada em sequências LSU, 61 sequências foram utilizadas (30 obtidas no presente estudo) apresentando 789 posições no alinhamento final. Destes, 620 foram constantes (78%), 131 variáveis parcimoniosos informativos (13%) e 38 parcimoniosos não informativos (5%). Para a análise combinada (ITS+LSU) somente sequências obtidas do mesmo espécime foram utilizados.

Para *Hymenochaete*, o *dataset* para a região ITS abrangeu 92 sequências, incluindo 35 obtidas neste trabalho. O alinhamento final apresentou 718 posições de alinhamento com 140 posições constantes (19%) e 562 variáveis (81%), destas 443 (62%) foram parcimoniosos informativos. Para região LSU, um total de 801 sequências foram alinhadas, obtendo-se 759 sítios, dos quais 671 eram caracteres conservados (34%) e 500 variáveis, porém 413 parcimoniosos informativos (54%).

Para a reconstrução filogenética geral da família Hymenochaetaceae, as árvores filogenéticas foram obtidas a partir do método de Máxima Verossimilhança (MV) com distância K81uf+G para a matriz de sequências LSU e GTR+G+I para combinada (sequências LSU+ITS), bem como por Inferência Bayesiana (IB) com distância GTR+G+I para ambas as matrizes (LSU e LSU+ITS). As árvores apresentaram pequenas divergências nos valores de suporte e praticamente as mesmas topologias para cada matriz, sendo utilizada a árvore de MV como base para cada caso (LSU e LSU+ITS, respectivamente figuras 5 e 6).

Nessas análises, todas as sequências disponibilizadas no presente estudo agruparam-se com suporte estatístico moderado/alto em um dos gêneros já conhecidos para a família: *Fomitiporia*, *Fulvifomes*, *Fuscoporia*, *Hymenochaete*, *Phellinus*, *Phellinotus* e *Tropicoporus*. Nos tópicos seguintes, cada gênero será discutido de modo isolado para avaliação do conceito das espécies em estudo.



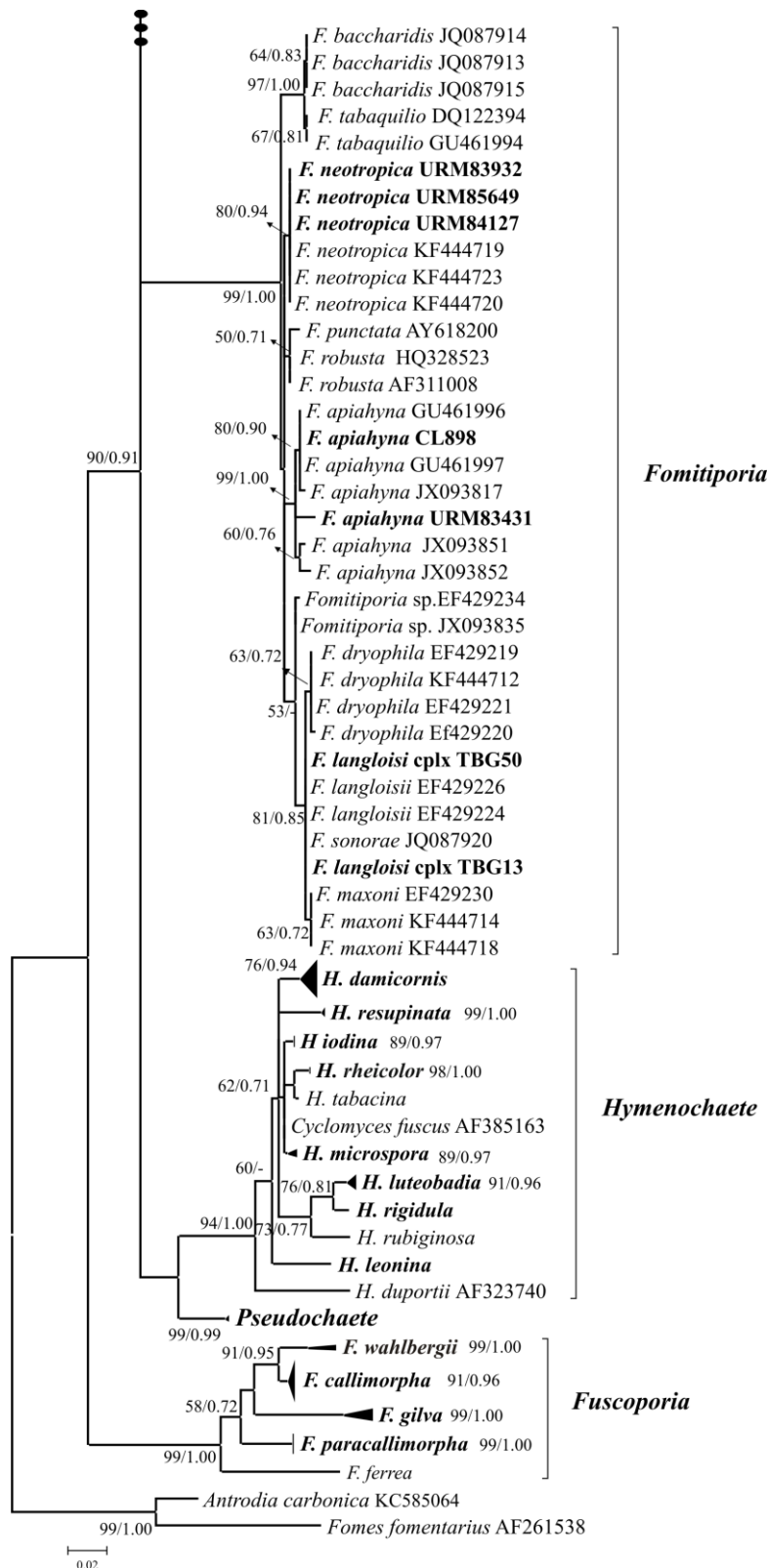


Figura 5. Reconstrução filogenética de *Hymenochaetaceae* baseada no alinhamento de 819 nucleotídeos da região LSU. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de Bootstrap (%) foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (MV) e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA).

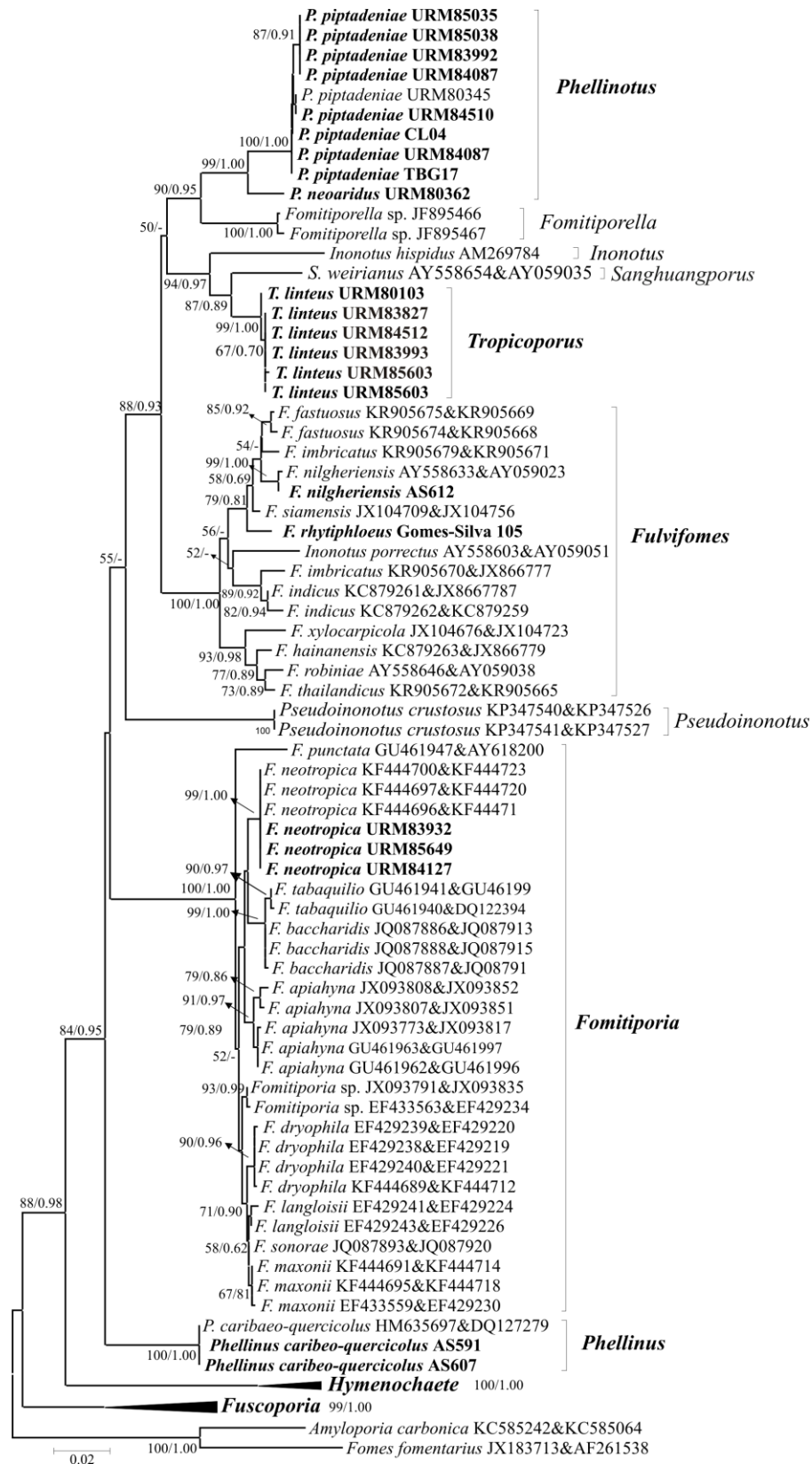


Figura 6. Reconstrução filogenética de *Hymenochaetaceae* baseada no alinhamento de 1217 nucleotídeos da região ITS+LSU. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de bootstrap (%) foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (MV) e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA).

4.2.1 Taxonomia morfológica e molecular de *Fulvifomes* Murrill

Fulvifomes Murrill foi reconhecido como gênero em 1914, com *F. robiniae* Murrill como espécie-tipo (Murrill 1914) e, historicamente, foi tratado como um dos sinônimos de *Phellinus* Quél. (RYVARDEN & JOHANSEN, 1980; RYVARDEN, 1991; NÚÑEZ & RYVARDEN, 2000). Posteriormente, Wagner & Fischer (2002a) confirmaram *Fulvifomes* como um gênero bem delimitado ao estudarem o grupo com base em sequências da região nLSU.

Este gênero é caracterizado pelo basidioma pileado, sistema hifálico dimítico, basidiosporos amarelados em KOH e ausência de setas himeniais (WAGNER & FISCHER, 2002a). No entanto, Dai (2010) expandiu esse conceito ao incluir espécies que possuíam setas himeniais, característica que, posteriormente, não foi aceita para o gênero com base em estudos moleculares (HATTORI *et al.*, 2014; ZHOU 2014, 2015).

O espécime brasileiro AS612 só teve sua identificação confirmada como *F. nilgheriensis* quando comparadas suas sequências LSU e ITS+LSU com as demais existentes no GenBank/NCBI (Figuras 5 e 6, respectivamente). *Fulvifomes nilgheriensis* possui ampla distribuição geográfica, sendo conhecida para África e Ásia, além de Cuba, Brasil, Estados Unidos (Flórida), Guiana e Antilhas Francesas (RYVARDEN & JOHANSEN, 1980; DAVID & RAJCHENBERG, 1985; GROPOSO *et al.*, 2007). Esta espécie sempre foi observada em troncos em decomposição, característica também registrada no presente estudo. Porém, Vlasák *et al.*, (2011) e Wagner & Fischer (2001, 2002a) relataram a ocorrência de *F. nilgheriensis* em hospedeiros vegetais vivos.

Ao estudarem táxons da Flórida (EUA), Vlasák *et al.*, (2011) observaram que a sequência ITS de um espécime identificado preliminarmente como *Phellinus* sp. apresentou 99% de identidade com uma sequência de *F. nilgheriensis*, identificando assim esse táxon com base nesse critério. No entanto, essa sequência não foi depositada em nenhum banco de nucleotídeos internacional. Resultado idêntico a partir da sequência ITS de AS612 foi obtido no presente estudo.

Já a sequência LSU de *F. nilgheriensis* AS612, além de possuir 99% de identidade com a sequência de *F. nilgheriensis* AY059023 a partir do Blastn, na reconstrução filogenética agruparam-se entre si com alto suporte estatístico (MV 90% e BA 0.98) (Figura 5), apresentando-se ainda estreitamente relacionada com *F. kawakamii* AY059028.

Fulvifomes nilgheriensis é diferenciado das demais espécies do gênero principalmente pela presença de basidiosporos amarelado-amarronzados, subglobosos e de parede fina, medindo $4-5(5.5) \times 4-4.5 \mu\text{m}$. *Fulvifomes kawakamii* é macromorfologicamente similar a *F. nilgheriensis*, no entanto somente conhecida para a localidade-tipo no Havaí (EUA). Um estudo a partir dos espécimes-tipos dessas espécies se faz necessário para confirmar a sinonimização de *F. kawakamii* com *F. nilgheriensis*.

O espécime Gomes-Silva 105, previamente identificado como *Fulvifomes rhytiphloeus* por morfologia, também apresentou-se distinto filogeneticamente das demais espécie do gênero (Figuras 5 e 6). Essa espécie, cujo espécime-tipo foi coletado no Brasil, caracteriza-se pelo basidioma solitário, aplanado, contexto marrom-amarelado com uma fina linha escura separando o tomento da superfície abhimenial, além de basidiosporos globosos a elipsóides, marrons-escuro e de parede espessa, medindo $4-5(5.5) \times 4-4.5 \mu\text{m}$ (Ryvarden 2004, como *Phellinus rhytiphloeus*; Campos-Santana *et al.*, 2015). O espécime *F. rhytiphloeus* Gomes-Silva 105 possui características similares às descritas acima. A combinação *Fulvifomes rhytiphloeus* (= *Phellinus rhytiphloeus*) proposta por Campos-Santana *et al.*, (2015) com base em dados morfológicos é confirmada no presente estudo, porém com evidências moleculares.

4.2.2 Taxonomia morfológica e molecular de *Phellinotus* Drechsler-Santos, Robledo & Rajchenb.

Phellinotus trata-se de um gênero recentemente proposto por Drechsler-Santos *et al.* (2016) com apenas duas espécies conhecidas: *Phellinotus piptadeniae* e *P. neoaridus*”, ambas com holótipos do Brasil. Este gênero, cujas espécies são parasitas de vegetais (obrigatórios ou facultativos), é caracterizado pelo basidioma pileado, sistema hifálico dimítico com hifas esqueléticas presentes apenas na trama, presença de linha negra no contexto, e basidiosporos subglobosos a elipsóides com parede fina, coloração amarela em KOH, indextrinóide, medindo $5-6 \times 3.6-5.0 \mu\text{m}$.

Embora *Phellinotus* apresente-se filogeneticamente próximo a *Fomitiporella*, *Arambarria* e *Inocutis* (Figuras 5 e 6), esses gêneros são facilmente discerníveis morfolologicamente entre si. *Arambarria* e *Inocutis* apresentam sistema hifálico monomítico, diferente de *Phellinotus* que é dimítico. Já *Fomitiporella* também apresenta sistema hifálico dimítico, porém suas espécies possuem hábito saprofítico, além de

possuírem basidiomas ressupinados, diferindo assim de *Phellinotus* nesses aspectos (WAGNER & FICHER 2002a; RAJCHENBERG *et al.*, 2015).

No presente estudo, seis espécimes preliminarmente identificados como *Phellinus baccharidis* *sensu* Ryvarden (2004) e dois *Phellinus* sp. se agruparam com alto suporte estatístico com a sequência do holótipo de *Phellinotus piptadeniae* (MV 99% e BA 1.00 para análise LSU; MV 100% e BA 1.00 para ITS+LSU, Figuras 5 e 6, respectivamente). *Phellinotus piptadeniae* caracteriza-se pela presença de basidiosporos subglobosos a elipsóides, não dextrinóides, medindo $5\text{--}5.3 \times 3.6\text{--}4\text{ }\mu\text{m}$. Todos os exemplares agrupados no clado com *P. piptadeniae* apresentam características semelhantes, apenas diferindo levemente em relação ao tamanho dos basidiosporos ($4.5\text{--}5.0 \times 3.5\text{--}4\text{ }\mu\text{m}$). Amalfi *et al.*, (2014) explicam que vários táxons neotropicais foram incorretamente identificados como *Phellinus baccharidis* (atualmente *Fomitiporia baccharidis*) devido à descrição original mencionar que esta espécie possuía basidiosporos indextrinóides similares a outras espécies de *Phellinus* s.l. No entanto, ao estudarem o tipo da espécie originário do Equador, Amalfi *et al.*, (2014) observaram que essa espécie possui basidiosporos fortemente dextrinóides medindo $5.0\text{--}6.5 \times 5.0\text{--}6.0\text{ }\mu\text{m}$, propondo assim a combinação *Fomitiporia baccharidis* (Pat.) Decock, Robledo & Amalfi. Desse modo, todos a identidade dos táxons identificados como *Phellinus baccharidis* para o Brasil precisa ser reavaliado.

A sequência obtida a partir do espécime URM83844 previamente identificado como *Phellinus rimosus* (Berk.) Pilát *sensu* Ryvarden (2004), agrupou-se com outras duas sequências de *Phellinotus neoaridus*, uma obtida do holótipo. *Phellinotus neoaridus* é morfologicamente bastante similar a *P. piptadeniae*, porém possui basidiosporos levemente maiores ($5.6\text{--}6 \times 4.2\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$ *versus* $5\text{--}5.3 \times 3.6\text{--}4.2\text{ }\mu\text{m}$ em *P. piptadeniae*) e hifas esqueléteas menores ($110\text{--}560\text{ }\mu\text{m}$ *versus* $230\text{--}754\text{ }\mu\text{m}$ em *P. piptadeniae*) (Drechsler-Santos *et al.*, 2016). Drechsler-Santos *et al.*, (2010) comentam que *P. piptadeniae* se desenvolve principalmente em *Piptadenia* spp., além de *Mimosa* sp. e *Senegalia* sp., enquanto *P. neoaridus* (como *Phellinus rimosus*) é somente conhecido em espécies de *Caesalpinia* sp, mencionando assim que dados ecológicos são relevantes para diferenciar essas espécies.

Drechsler-Santos *et al.*, (2016) mencionam ainda que espécies pertencentes ao complexo *Phellinus rimosus* são caracterizados pelo basidioma pileado, lenhoso e de píleo rimoso, sistema hifálico dimítico, ausência de setas himeniais e basidiosporos

elipsóides, características que também são observadas em *Phellinotus* e *Fulvifomes*. Desse modo, evidencia-se que para espécies do complexo *Phellinus rimosus* estudos baseados em sequências de DNA são fundamentais para a correta inserção em *Phellinotus* ou *Fulvifomes*.

4.2.3 Taxonomia morfológica e molecular de *Tropicoporus* L.W. Zhou, Y.C. Dai & Sheng H. Wu

Tropicoporus foi proposto por Zhou *et al.*, (2015) para acomodar espécies de basidioma efuso-reflexo a pileado, sistema hifálico dimítico e com basidiosporos subglobosos a elipsóides de coloração amarela, indextrinóides, medindo $3.4\text{--}6 \times 2.9\text{--}5.0$ μm , além da presença setas himeniais. Este gênero possui características bastante similares às de *Inonotus* e foi separado deste somente a partir de reconstruções filogenéticas baseadas em sequências ITS e LSU (ZHOU *et al.*, 2015).

Até o momento, são conhecidas nove espécies para o gênero, incluindo *T. linteus* (= *Inonotus linteus*), que apresenta como principais características: basidioma pileado, setas himeniais abundantes a raras ($17\text{--}35 \times 6\text{--}8$ μm) e basidiosporos subglobosos medindo $4.5\text{--}6 \times 4.0\text{--}5.0$ μm (Ryvarden 2004, como *Phellinus linteus*). Os exemplares URM83827, URM84512, URM85603 e URM80103 que se agruparam com *T. linteus* apresentam características similares às descritas para a espécie, exceto pela visível linha negra no contexto, característica até então não relatada para *Tropicoporus*.

O exemplar URM80103 sequenciado no presente estudo, assim como outros exemplares provenientes da Amazônia brasileira, foi utilizado por Gomes-Silva *et al.*, (2013) para propor a combinação *Inonotus calcitratus* (Berk. & M.A. Curtis) Gomes-Silva & Gibertoni, espécie anteriormente inserida em *Phellinus* (*P. calcitratus*). Esta espécie é morfológicamente muito similar a *T. linteus*, exceto pela presença de linha negra no contexto, característica que até então era desconhecida para *Tropicoporus*. Desse modo, propomos aqui a sinonimização de *I. calcitratus* a *T. linteus*.

4.2.4 Taxonomia morfológica e molecular de *Phellinus* Quél.

Phellinus Quél. tem sido utilizado para acomodar espécies de Hymenochaetaceae poróides que possuem sistema hifálico dimítico e basidioma geralmente perene. Historicamente, diversos autores sugeriram a manutenção do gênero, porém segregando-o em gêneros menores, como *Inocutis*, *Fomitiporella*, *Fulvifomes*, *Fomitiporia*, *Fuscoporia* e *Pseudoinonotus* a partir de evidências morfológicas e moleculares (WAGNER & FISCHER, 2001, 2002a; DECOCK *et al.*, 2007). No presente estudo, a partir de sequências LSU, *Phellinus* apresentou-se como grupo polifilético e sua separação em relação a *Pseudoinonotus* mostrou-se incerta (Figura 5). No entanto, com a realização de uma análise combinada (sequências ITS e LSU, Figura 6), a diferenciação entre *Phellinus* e *Pseudoinonotus* foi evidente, com o primeiro apresentando-se como grupo monofilético com alto suporte estatístico (MV 100% e BA 1.00). Estes resultados demonstram a importância de se utilizar mais de uma região do DNA nos estudos filogenéticos em Hymenochaetaceae.

Phellinus caribaeo-quercicola Decock & S. Herrera foi descrita por Decock *et al.*, (2006) com base em espécimes coletados em Cuba. Esta espécie apresenta basidiomas ressupinados, geralmente com várias camadas de túbulos quando mais velhas, e é caracterizada principalmente pela presença de setas himeniais espessas, com ápice em forma de gancho (na maioria) e com medidas de $15.0\text{--}28.0 \times 6.0\text{--}11.0 \mu\text{m}$, além de possuir basidiosporos elipsóides, hialinos, não dextrinóides e de parede fina, medindo $4.5\text{--}5.5 \times 3.5\text{--}4.5 \mu\text{m}$.

Decock *et al.*, (2006) mencionam que *P. caribaeo-quercicola* é restrita ao oeste de Cuba em uma área caracterizada por grave seca no inverno, desenvolvendo-se exclusivamente em troncos ou ramos senescentes ou em tocos em decomposição de *Quercus cubana*. Esses caracteres ecológicos foram considerados relevantes para diferenciá-la de *P. undulatus*, espécie de distribuição neotropical, incluindo Cuba (DECOCK *et al.*, 2006), encontrada em troncos de angiospermas em decomposição e morfológicamente semelhante a *P. caribaeo-quercicola* (DECOCK *et al.*, 2006). Posteriormente, Vlasák *et al.*, (2011) identificaram, a partir de sequências ITS rDNA e morfologia, três espécimes de *P. caribaeo-quercicola* coletados na Flórida (EUA) em troncos e ramos mortos de *Quercus virginiana*, ampliando assim o conhecimento sobre a distribuição geográfica e o substrato dessa espécie.

Os espécimes AS591 e AS607 apresentam características morfológicas bastante similares à descrição de *P. caribaeo-quercicola*, além de possuírem sequências ITS e LSU com 99% e 100% de identidade com as sequências correspondentes ao holótipo que foram depositadas pelos autores que descreveram a espécie (DECOCK *et al.*, 2006). No entanto, os espécimes brasileiros aqui analisados foram coletados em áreas preservadas da Amazônia e foram encontrados em troncos de angiospermas em decomposição. Além disso, sabe-se que *Quercus* não ocorre naturalmente no Brasil (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>).

4.2.5 Taxonomia morfológica e molecular de *Fomitiporia* Murrill

Fomitiporia foi originalmente descrito por Murrill (1907) a partir de espécimes de *F. langloisii* coletados no sudeste do EUA (Louisiana), porém, até os primeiros estudos de filogenia molecular, este gênero foi considerado como um dos numerosos sinônimos taxonômicos de *Phellinus s.l.* (LARSEN & COBB-POULLE, 1990; RYVARDEN, 1991; RYVARDEN & GILBERTSON, 1994; RYVARDEN & JOHANSEN, 1980; WAGNER & FISCHER, 2001, 2002a; DECOCK *et al.*, 2007; DAI *et al.*, 2008). Este gênero caracteriza-se por apresentar basidiosporos globosos a subglobosos, dextrinóides e de parede espessa, além de possuir sistema hifálico dimítico/pseudodimítico. Os basidiomas podem ser ressupinados (espécies do complexo *F. langloisii*) ou pileados (espécies do complexo *F. punctata*) (DECOCK *et al.*, 2007; AMALFI *et al.*, 2012; CAMPOS-SANTANA *et al.*, 2014; AMALFI *et al.*, 2014).

Confirma-se neste estudo o monofiletismo de *Fomitiporia* (Figura 5 e 6). Além disso, as três sequências de *F. neotropica* geradas no presente estudo (espécimes previamente identificados como *F. maxonii*) agruparam-se com moderado suporte estatístico com outras da mesma espécie para a América do Sul cujas sequências encontravam-se disponíveis no GenBank/NCBI (análise LSU: MV 80% e BA 0.92; análise combinada: MV 99% e BA 0.99).

Campos Santana *et al.*, (2014) descreveram *F. neotropica* com base em espécies do sul do Brasil (Rio Grande do Sul e Santa Catarina), Argentina central (Córdoba) e Guiana Francesa, disponibilizando as primeiras sequências de DNA da espécie. Esta espécie é morfológicamente variável, caracterizada principalmente por possuir basidioma ressupinado com margem branca a amarela, sistema hifálico dimítico, superfície himenial

com poros circulares (6–9 por mm) e setas himeniais ventricosas (quando presentes) medindo $10.0\text{--}30.0 \times 3.5\text{--}6.5$ (–7.0) μm . Além disso, possui basidiosporos subglobosos a globosos, hialinos, fortemente dextrinóides com $5.0\text{--}7.0$ (–7.5) $\times$ $4.5\text{--}7.0$ μm . Os espécimes URM83932, URM84127 e URM85649 possuem características similares às descritas para a espécie, destacando-se a ausência de setas himeniais para todos os exemplares. No entanto, no exemplar URM85649 foi observado esporos fracamente dextrinóides, ao contrário dos demais que apresentaram-se fortemente dextrinóides.

Embora filogeneticamente distinta, *F. neotropica* pertence ao complexo *F. langloisii* (*F. dryophila*, *F. langloisii*, *F. maxonii* e *F. sonarae*) e a partir da taxonomia convencional não é possível observar diferenças morfológicas significativas entre as espécies desse complexo (DECOCK *et al.*, 2007; RYVARDEN, 2004; VLASÁK *et al.*, 2011; CAMPOS-SANTANA *et al.*, 2014). Campos Santana *et al.*, (2014) tentaram diferenciar *F. neotropica* em relação a *F. maxonii*, por exemplo, de acordo com a presença de setas himeniais, já que para *F. maxonii* esta característica nunca foi observada. No entanto, a presença de setas himeniais em *F. neotropica* não é uma regra, fato confirmado para os espécimes aqui analisados. Observou-se ainda que o tamanho de basidiosporos entre as espécies desse complexo são similares, principalmente entre *F. dryophila*, *F. langloisii*, *F. maxonii* e *F. sonarae* (CAMPOS-SANTANA *et al.*, 2014).

Numa perspectiva filogeográfica, essas espécies que sempre se apresentam em clados relacionados foram descritas a partir de espécimes de localidades geográficas próximas: *F. dryophila* (Mississipi, EUA), *F. langloisii* (Flórida, EUA), *F. maxonii* (Costa Rica) e *F. neotropica* (Guiana Francesa) (DECOCK *et al.*, 2007; RYVARDEN, 2004; VLASÁK *et al.*, 2011; CAMPOS-SANTANA *et al.*, 2013). Além disso, espécimes de *F. maxonii* e *F. neotropica*, por exemplo, já foram listadas para a mesma localidade geográfica na Argentina (CAMPOS-SANTANA *et al.*, 2014).

Pelo acima exposto, os espécimes aqui analisados só puderam ter sua confirmação taxonômica confirmada a partir da análise das sequências ITS e LSU, tratando-se dos primeiros registros da espécie para o Nordeste do Brasil.

Os exemplares CRL898 e URM83431 tiveram a identificação confirmada como *F. apiahyna* com base em sequências LSU (Figura 5). De modo similar, ao estudarem espécimes de *Fomitiporia* da Flórida, Vlasák *et al.*, (2011) também identificaram um espécime como *F. apiahyna* somente a partir de dados moleculares. Esta espécie caracteriza-se pela presença de basidioma pileado escuro com uma crosta negra de

espessura variável que, dependendo da idade, cobre todo o contexto que é homogêneo. Além disso, possui basidiosporos medindo $5.0\text{--}6.5\text{--}(7.0) \times (4.5\text{--}) 5.0\text{--}6.0\text{ }\mu\text{m}$, similares aos de *F. baccharidis*. No entanto, *F. baccharidis* possui contexto heretogêneo (duplex) com duas camadas de consistências diferentes separadas por uma linha negra, característica única entre as espécies do gênero (AMALFI *et al.*, 2014). Estas duas espécies são facilmente separadas com a utilização de dados moleculares (Figuras 5 e 6).

A partir da análise das sequências LSU, os espécimes URM83932, TBG50 e TBG13 apenas puderam ser identificados como pertencentes ao complexo taxonômico *F. langloisii* (Figura 5). Não foi possível a obtenção das sequências da região ITS desses espécimes, possivelmente devido à pigmentação dos extratos de DNA que afetaram o funcionamento das reações de PCR. Este resultado evidenciou a importância de se realizar análises moleculares com base em mais de uma região do DNA que possua alta variabilidade interespecífica, pois a partir da combinação das sequências ITS e LSU, esse complexo apresentou melhor delineamento em relação ao estudo da região LSU de modo isolado (Figura 6).

4.2.6. Taxonomia morfológica e molecular de *Fuscoporia* Murrill

Fuscoporia é um gênero bem estabelecido em Hymenochaetaceae e foi originalmente descrito por Murrill (1907) com *F. ferruginosa* (Schrad.) Murrill como espécie-tipo. Porém, historicamente o gênero também foi considerado sinônimo de *Phellinus* s.l. (FIASSON, 1982; FISCHER, 1996), até que Wagner & Fischer (2001, 2002a) realizaram as primeiras análises filogenéticas de Hymenochaetaceae baseadas em sequências LSU e confirmaram *Fuscoporia* como gênero bem delimitado e distinto de *Phellinus* s.s.

O gênero é caracterizado pelo basidioma ressupinado a pileado, anual ou perene, sistema hifálico dimítico com hifas generativas hialinas, de parede fina e septo simples, além dos basidiosporos hialinos, globosos a ovóides (MURRILL, 1907; WAGNER & FISCHER, 2001, 2002a; BALTAZAR *et al.*, 2009). *Fuscoporia* inclui 40 espécies de ampla distribuição geográfica (DAI, 1999; WAGNER & FISCHER, 2001, 2002b; BALTAZAR *et al.*, 2009; VLASÁK *et al.*, 2011), das quais 11 são relatadas para o Brasil (BALTAZAR *et al.*, 2009; GIBERTONI *et al.*, 2015).

A identificação de espécies em *Fuscoporia* é tradicionalmente baseada em dados morfológicos, como consistência e coloração do basidioma, padrão de zonação da superfície abhimenial, tamanho dos poros no himênio, tamanho e forma das setas himeniais e dos basidiosporos (GROPOSO *et al.*, 2007; BALTAZAR *et al.*, 2009; VLASÁK *et al.*, 2011; RAYMUNDO *et al.*, 2013). Entretanto, algumas espécies possuem alta plasticidade fenotípica que alerta, pelo menos para a América do Norte (VLASÁK *et al.*, 2011) e Tailândia (INSUMRAN *et al.*, 2012), que *Fuscoporia* pode incluir espécies cuja delimitação só pode ser observada a partir de sequências de DNA. Nessas abordagens, as regiões do rDNA são as mais utilizadas (INSUMRAN *et al.*, 2012; BALASUNDARAM *et al.*, 2015).

Devido ao grande número de sequências, a análise de *Fuscoporia* foi realizada separadamente dos demais gêneros da família. A reconstrução filogenética de *Fuscoporia* baseada em análises MP, MV e BA para ITS, LSU e ITS+LSU apresentaram basicamente a mesma topologia e pequenas diferenças nos valores de *bootstraps* e de probabilidades a posteriori para cada matriz (Figuras 7, 8 e 9). No corrente estudo, todos os espécimes estudados agruparam-se em quatro clados distintos, delimitando assim quatro espécies: *F. callimorpha* (A), *F. wahlbergii* (B), “*F. paracallimorpha*” (C) e *F. gilva* (D).

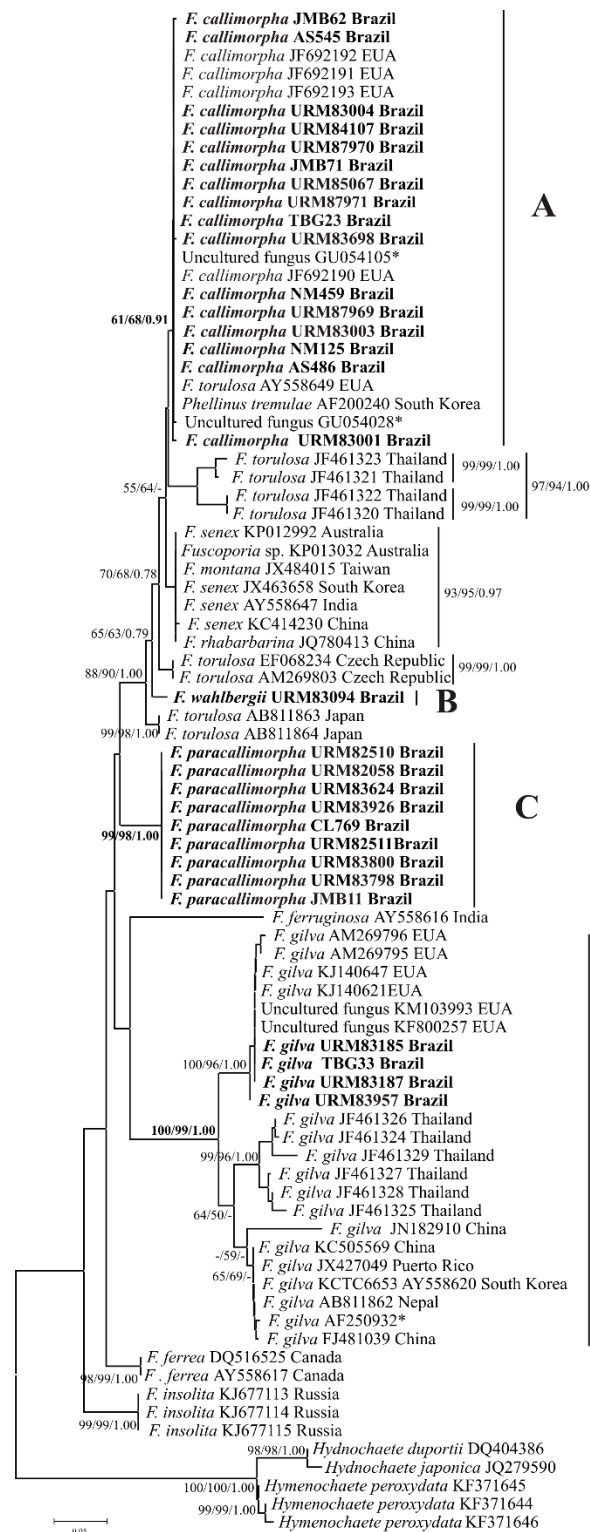


Figura 7. Reconstrução filogenética de *Fuscoporia* baseada no alinhamento de 391 nucleotídeos da região ITS. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de Bootstrap (%) foram gerados a partir do método de Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (MV), e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA), respectivamente. Para MP: Índice de Consistência (CI) = 0.6055 e Índice de Retenção (RI) = 0.9023. *Área de coleta não disponível.

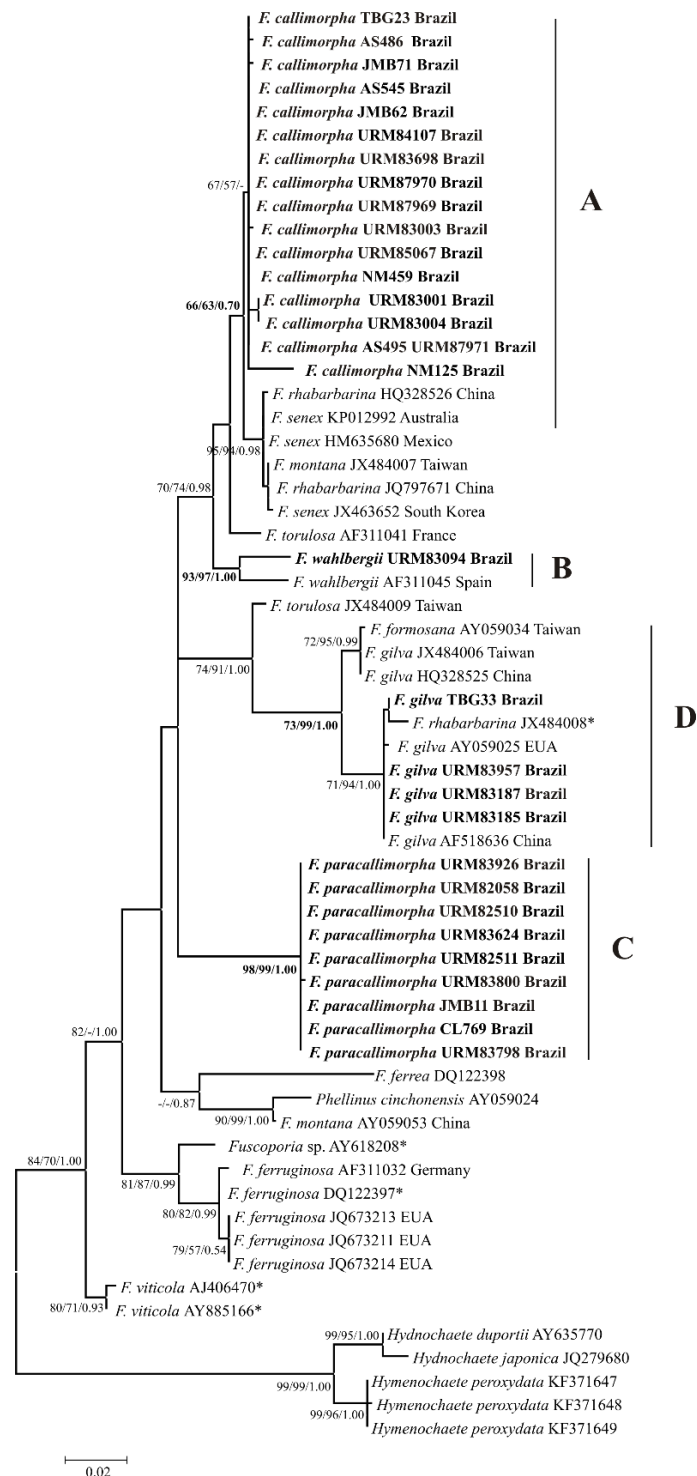


Figura 8. Reconstrução filogenética de *Fuscoporia* baseada no alinhamento de 789 nucleotídeos da região LSU. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de Bootstrap (%) foram gerados a partir do método de Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (MV), e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA), respectivamente. Para MP: Índice de Consistência (CI) = 0.5909 e Índice de Retenção (RI) = 0.8808. *Área de coleta não disponível.

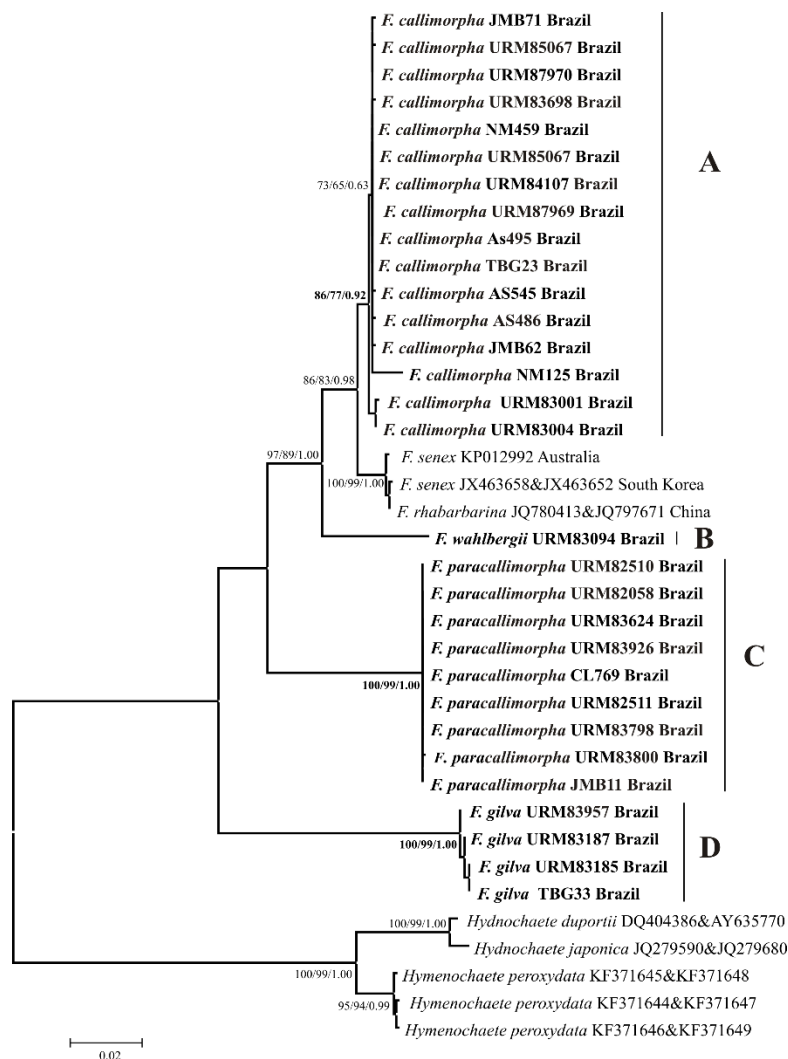


Figura 9. Reconstrução filogenética de *Fuscoporia* baseada no alinhamento de 1173 nucleotídeos relativos a combinação das regiões ITS e LSU. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de Bootstrap (%) foram gerados a partir do método de Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (MV), e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA), respectivamente. Para MP: Índice de Consistência (CI) = 0.8917 e Índice de Retenção (RI) = 0.8917.

Nas análises baseadas em sequências ITS (Figura 7), o clado A foi formado por 16 espécimes de *F. callimorpha* (originários da Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado), três de *F. callimorpha* e um de *F. torulosa* dos Estados Unidos (Flórida e Ilhas Virgens), dois *uncultured fungi* e um de *Phellinus tremulae* da Coreia do Sul, todos filogeneticamente distintos das outras espécies de *Fuscoporia* incluídas na análise. Nas análises LSU e ITS+LSU (Figuras 8 e 9, respectivamente), o clado A foi formado exclusivamente pelas sequências de 16 espécimes de *F. callimorpha* disponibilizadas no presente estudo (Figura 8: MP 66%, ML 63% e BA 0.70; Figura 9: MP 86%, ML 77% e BA 0.92).

Fuscoporia callimorpha foi descrita com base em espécimes de Madagascar e é caracterizada pela superfície abhimenial glabra, fortemente e concentricamente sulcada e

zonada, setas himeniais ventricosas de parede fina e ápice afinado [$23.4\text{--}32.4$ (-36.0) $\times$ (4.3--) $4.6\text{--}5.4$ μm], e basidiosporos elipsóides, hialinos, medindo (3.2) $3.6\text{--}3.9$ (-4.3) $\times$ 2.2 μm [RYVARDEN & JOHANSEN, 1980, como *Phellinus callimorphus*; CORNER, 1991; GROPOSO *et al.*, 2007; VLASÁK *et al.*, 2011; RAYMUNDO *et al.*, 2013). Todos os espécimes brasileiros apresentam características similares às descritas (Figura 10).

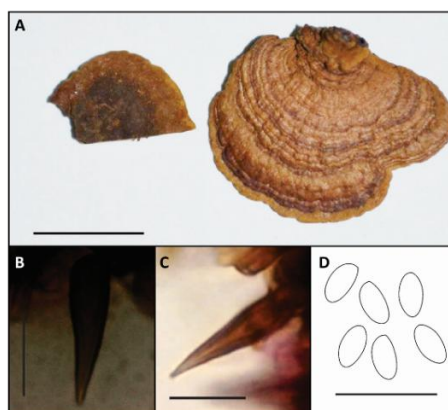


Figura 10. Morfologia de *F. callimorpha*. A. Basidioma; B e C. Setas himeniais; D. Basidiosporos. Escala: A = 1 cm; B and C = 5 μm ; Fig. D = 10 μm .

Os espécimes de *F. torulosa* CBS182.34 (EUA) e *Phellinus tremulae* IMSNU3202 também se agruparam com os representantes de *F. callimorpha* neotropicais. Nesses casos, é provável que se trate de exemplares de *F. callimorpha* incorretamente identificados. Este resultado está de acordo com Vlasák *et al.*, (2011), que ao estudarem *Fuscoporia* de diferentes áreas dos Estados Unidos (análise morfológica e molecular) mencionam que *F. torulosa* provavelmente não ocorre nesse país.

No presente trabalho, os espécimes sem identidade (GU054028 e GU054105) também tiveram sua identificação possibilitada a partir de sequências ITS, tratando-se de *F. callimorpha* que foram provavelmente coletados na Alemanha de acordo com dados do GenBank/NCBI.

Próximo ao clado A (Figura 7), quatro espécimes da Tailândia identificados como *F. torulosa* (JF461320 a JF461323) formaram um agrupamento irmão a *F. callimorpha* com alto suporte estatístico (MP 100%, MV 98% e IB 1.00). No entanto, a identificação desses espécimes como *F. torulosa* é discutível. Embora essas sequências estejam depositadas no GenBank como *F. torulosa*, Insumran *et al.*, (2012), os autores da sequência, discutiram esses espécimes como sendo *Fuscoporia* sp., mencionando ainda que os atuais caracteres morfológicos utilizados na identificação de *Fuscoporia* não foram

suficientes para a identificação desses espécimes. *Fuscoporia torulosa* foi descrita com base em espécimes da França e atualmente é citada para a Europa e sudeste da Ásia (RYVARDEN & JOHANSEN, 1980; RAYMUNDO *et al.*, 2013).

A presença de *F. torulosa* em outros dois agrupamentos baseados em sequências de ITS (um formado por dois espécimes do Japão e o segundo por dois exemplares da República Tcheca, Figura 7) e em dois agrupamentos baseados nas sequências LSU (um formado por dois espécimes da França e o outro por um exemplar de Taiwan, Figura 8) demonstram que *F. torulosa* é um complexo taxonômico. Desse modo, mais estudos morfológicos e filogenéticos são necessários, principalmente para espécimes asiáticos, a fim de proporcionar melhor compreensão do conceito de *Fuscoporia torulosa*.

Nas análises de LSU, o clado B foi formado por dois espécimes de *F. wahlbergii* originários do Brasil e da Espanha (Ilhas Canárias), e pelo espécime brasileiro nas análises ITS e ITS+LSU, sendo, contudo, uma espécie bem delimitada em todas as análises aqui realizadas. Esta espécie originalmente descrita para a África do Sul possui como principal característica diagnóstica a presença de setas himeniais de ápice curvado, medindo $15\text{--}30\text{--}(35) \times 6\text{--}9\text{ }\mu\text{m}$ [RYVARDEN, 1994, 2004, como *P. wahlbergii*], característica também observada em *Phellinus caribaeo-quercicola*. Pode-se observar ainda em *F. wahlbergii* a presença de basidiosporos hialinos a amarelados, subglobosos a elipsóides, medindo $4\text{--}5 \times 3.5\text{--}4.5\text{ }\mu\text{m}$ (RYVARDEN, 1994, 2004). O espécime de *Fuscoporia wahlbergii* coletado no Brasil URM83094 possui setas himeniais ($15\text{--}25 \times 6\text{--}7\text{ }\mu\text{m}$) e basidiosporos ($4.0\text{--}4.5 \times 3.0\text{--}3.5\text{ }\mu\text{m}$) com morfologia e tamanhos similares aos já descritos para a espécie por Ryvardeen (1994, 2004), conforme figura 11.

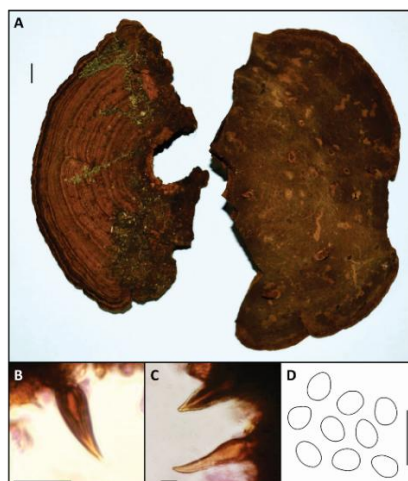


Figura 11. Morfologia de *F. wahlbergii*. A. Basidioma; B e C. Setas himeniais; D. basidiosporos. Escala: A = 1 cm; B and D = 10 μ m; C = 5 μ m.

Representantes da espécie nova proposta no presente estudo, *F. paracallimorpha*, formaram o clado C com alto suporte estatístico em todas as análises (análises ITS: MP 99%, ML 99% e BA 1.00; Análises LSU: MP 98%, ML 99% e BA 1.00; Análises ITS+LSU: MP 100%, ML 99% e BA 1.00). Essa espécie é morfologicamente idêntica a *F. callimorpha*, sendo separada desta apenas com base em dados moleculares e, possivelmente, distribuição geográfica.

Taxonomia

Fuscoporia paracallimorpha Lima-Júnior, Lira & Gibertoni, *sp. nov.*, Figura 12.

MycoBank: MB814484

Fuscoporia paracallimorpha é caracterizada pela forte zonação, setas himeniais lanceoladas a ventricosas (20–25 $\times$ 4.0–4.5 μ m) e basidiosporos elipsóides [(4.0–4.5 $\times$ (2.5) 3.0–3.5 μ m).

Holótipo:—BRASIL. Ceará: Crato, Floresta Nacional do Araripe-Apodí, C.R.S. Lira 872, Maio 15, 2012 (URM83800, Isotypus O).

Etimologia:— *Para* (Grego) = comparado com; *calli* (Grego) = bonito; *morphus* (Grego) = forma; referindo-se à semelhança com *Fuscoporia callimorpha*.

Basidioma anual a bianual, séssil, 2 a 13 cm de comprimento, 1 a 2 cm de largura, 0.1–0.3 cm de espessura, lenhoso em alguns espécimes e coriáceo em outros. Píleo marrom-claro a marrom-escuro (12 fulvous to 17 snuff brown), amplamente aderido a dimidiado, aplanado, às vezes imbricado, sulcado, concentricamente zonado com zonas de diferentes

larguras e cores, consistência coriácea a rígida. Margem aguda ou levemente recortada, marrom-claro (12 fulvous). *Contexto* homogêneo, marrom-claro (12 fulvous), 0.1–0.2 cm. Poros circulares a angulares, 7–9 poros/mm, marrom-escuros (17 snuff brown), tubos marrom-acinzentados (51 buff), 0.1 cm. Sistema hifálico dimítico, hifas generativas hialinas, com paredes delgadas e septos simples, 1.5–2.8 μm diam, hifas esqueléticas amareladas a marrons, com parede espessa, 2.5–3.9 μm diam. Setas himeniais lanceoladas a ventricosas, de parede fina, marrom, 20–25 $\times$ 4.0–4.5 μm . Basídios clavados, hialinos, parede fina, 9.0–13 $\times$ 4.0–4.5 μm . *Basidiosporos* elipsóides, parede fina, hialinos, 4.0–4.5 $\times$ (2.5) 3.0–3.5 μm , IKI-.

Habitat:— Troncos de angiospermas em decomposição.

Distribuição:— Até o momento, conhecido apenas para o Nordeste do Brasil.

Espécimes examinados:— BRASIL. Bahia: Santa Terezinha, Serra da Jibóia, T.B. Gibertoni 36, 24 de setembro, 2010 (URM83624 como *Phellinus gilvus*). Ceará: Crato, FLONA Araripe-Apodi, C.R.S. Lira 919, 17 de maio, 2012 (URM83798 como *P. gilvus*); C.R.S. Lira 872, 15 de maio, 2012 (URM83800 como *P. gilvus*). Pernambuco: Triunfo, Sítio Carro Quebrado, C.R.S. Lira & N.C. Lima-Júnior 16, 01 de março, 2010 (URM82510 como *P. gilvus*); C.R.S. Lira & N.C. Lima-Júnior 9, 01 de março, 2010 (URM82511 como *P. gilvus*); C.R.S. Lira & C.A.S. Trajano 23, 28 de janeiro, 2010 (URM82508 como *P. gilvus*); C.R.S. Lira 769, 29 de janeiro, 2014. Piauí: Caracol, PARNA Serra das Confusões, C.R.S. Lira 541, 14 de março, 2012 (URM83926 como *P. gilvus*).

Espécimes adicionalmente examinados. *Fuscoporia callimorpha*:— BRASIL. Distrito Federal: Brasília, PARNA de Brasília, T.B. Gibertoni 26, Outubro, 2013 (URM87970). Pará: Melgaço, FLONA de Caxiuanã, Melgaço, A.S. Silva 495, 08 de agosto, 2013 (URM87971). Paraíba, Areia, RE Mata do Pau-Ferro, C.R.S. Lira 634, 16 de abril, 2012 (URM83698); Paraíba, Areia, RE Mata do Pau-Ferro, C.R.S. Lira 1307, 16 de julho, 2013 (URM85067); C.R.S. Lira 207, 21 de julho, 2012 (URM84107). Rio de Janeiro: Angra dos Reis, PE de Ilha Grande, T.B. Gibertoni 05, Dezembro 2012 (URM87969). Rondônia: Porto Velho, EE de Cuniã, A.C. Gomes-Silva, E.A. Souza & M.C. Flores 2080, 11 de fevereiro, 2011 (URM83001); A.C. Gomes-Silva, E.A. Souza & M.C. Flores 2209, 11 de fevereiro, 2011 (URM83003); A.C. Gomes-Silva, E.A. Souza & M.C. Flores 2173, 11 de fevereiro, 2011 (URM83004). *Fuscoporia gilva*:— BRASIL: Piauí: Caracol, Serra das Confusões, A.C. Gomes-Silva 295, 29 de março, 2011 (URM83185); A.C. Gomes-Silva

361, 31 de março, 2011 (URM83187); C.R.S. Lira 570, 15 de março, 2012 (URM83957). Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, PARNA Tijuca, T.B. Gibertoni 33, Novembro, 2012 (URM87972).

Observações:— A nova espécie é macro- e micromorfológicamente similar a *F. callimorpha* [superfície do píleo fortemente zonada, setas himeniais ventricosas (15) $23.4\text{--}32.4$ ($\text{--}36.0$) $\times$ (2.5–) $4.6\text{--}5.4$ μm , basidiosporos hialinos e elipsóides (3.2–) $3.6\text{--}3.9$ ($\text{--}4.3$) $\times$ 2.2 μm] (Fig. 10). Entretanto, essas duas espécies são claramente distintas de acordo com análises baseadas em sequências ITS e LSU (rDNA) (Figuras 7, 8 e 9). Adicionalmente, em constantes viagens a campo em áreas com diferentes elevações em quatro das cinco regiões do Brasil e em quatro biomas (Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado), todas as amostras de *F. paracallimorpha* foram coletados apenas em matas de altitudes entre 550 m e 1200 m no Nordeste do Brasil, indicando que esta espécie pode ser endêmica para esta região e para este tipo de ecossistema. No Brasil, *F. callimorpha* foi coletado na Amazônia, Cerrado e em matas montanhosas e costeiras da Mata Atlântica. *Fuscoporia gilva* também é similar a *F. callimorpha* e *F. paracallimorpha*, mas diferencia-se pelo padrão de zonação da superfície abhimenial (fortemente zonado em *F. callimorpha* e *F. paracallimorpha*, e levemente zonado a azonado em *F. gilva*) (*F. callimorpha* – Fig. 10A and *F. gilva* – Fig. 13A). Adicionalmente, em nossos estudos, *F. gilva* foi coletado somente em matas montanhosas e costeiras da Mata Atlântica.

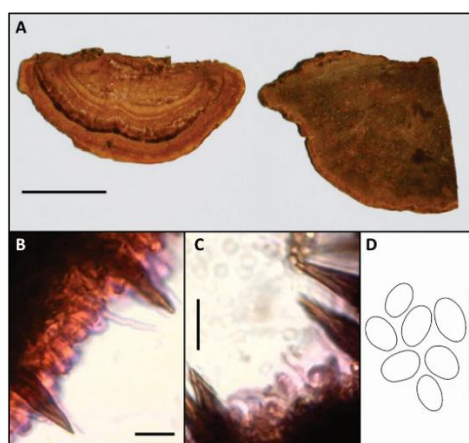


Figura 12. Morfologia de *F. paracallimorpha*, sp. nov. A. Basidioma; B e C. Setas himeniais; D. Basidiosporos. Escala: A = 1 cm; B–D = 10 μm .

Nos últimos anos, a presença de espécies crípticas em Hymenochaetaceae vem sendo discutida, particularmente em *Fomitiporia* (AMALFI *et al.*, 2010, 2013 e 2014) e *Fuscoporia* (VLASÁK *et al.*, 2011; INSUMRAN *et al.*, 2012). Vlasák *et al.*, (2011), devido à alta plasticidade fenotípica observada para *F. callimorpha*, mencionam que essa espécie poderia encobrir mais de uma espécie morfológicamente similar. Esta observação foi confirmada no presente estudo a partir da utilização de dados moleculares.

Em todas as análises, o clado D foi formado por espécimes de *F. gilva* com alto suporte estatístico (análise ITS: MP 100%, ML 99% and BA 1.00; LSU: MP 99%, ML 98% and BA 1.00; análise ITS+LSU: MP 100%, ML 99% and BA 1.00). Nas análises baseadas em sequências de ITS, o primeiro agrupamento foi formado exclusivamente por espécimes da Ásia, o segundo por espécimes da Ásia e um de Porto Rico e o terceiro por espécimes da América coletados no Brasil e Estados Unidos, este último a localidade do espécime-tipo. Nas análises LSU, devido à ausência de sequências no GenBank/NCBI, apenas dois agrupamentos puderam ser observados, um exclusivamente com os espécimes da Ásia e outro com espécimes do Brasil, Estados Unidos, Taiwan e China. *Fuscoporia gilva* é uma espécie cosmopolita, comum em regiões tropicais e subtropicais e que possui ampla variação morfológica (RYVARDEN & JOHANSEN, 1980, como *P. gilvus*; CORNER, 1991, como *P. gilvus*; RYVARDEN, 2004, como *P. gilvus*; BALTAZAR *et al.*, 2009; VLASÁK *et al.*, 2011; RAYMUNDO *et al.*, 2013; CAMPOS-SANTANA *et al.*, 2015).

Todos os espécimes de *F. gilva* aqui analisados apresentaram basidioma sésil, superfície do píleo azonado a levemente zonado, sulcado e glabro, setas himeniais aculeadas medindo $16\text{--}25 \times 3.0\text{--}5.0 \mu\text{m}$, além de basidiosporos subglobosos a elipsóides com $4.0\text{--}5.0 \times 2.5\text{--}3.0 \mu\text{m}$ (Figura 13). Estas características estão de acordo com Ryvarden (2004, as *P. gilvus*) e Campos-Santana *et al.*, (2015), que também analisaram espécimes provenientes do Brasil. No entanto, as setas himeniais aqui observadas foram levemente menores quando comparadas às descritas por Raymundo *et al.*, (2013) para espécimes do México ($20\text{--}45 \times 6\text{--}10 \mu\text{m}$).

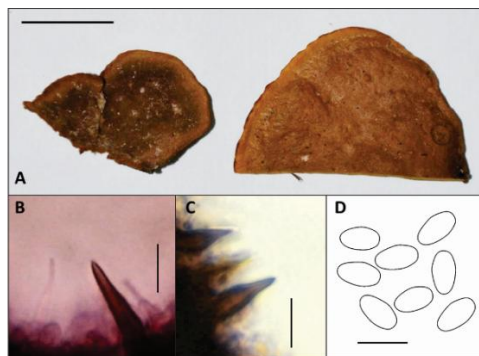


Figura 13. Morfologia de *F. gilva*. A. Basidioma; B e C. Setas himeniais; D. Basidiosporos. Escala: A = 1 cm; B–C = 10 µm.

Corner (1991) utilizou a consistência do contexto e o tipo de zonação da superfície pilear para propor variedades em *Phellinus gilvus* (= *F. gilva*): *F. gilva* var. *licnoides* (Mont.) Lloyd caracterizado pelo contexto fino e superfície do píleo distintamente zonado, e *F. gilva* var. *scruposa* (Fr.) Corner para espécimes com contexto mais grosso e superfície do píleo sem zonação. Entretanto, Ryvarden & Johansen (1980) descrevem *F. gilva* como de píleo azonado [característica também confirmada por Vlasák *et al.*, (2011)] a levemente zonado. Loguercio-Leite & Wright (1995), Ryvarden (2004) e Raymundo *et al.*, (2013) descrevem a espécie como de píleo sem zonação a zonado, sem mencionar o padrão de zonação. Neste estudo, concordamos com as descrições de Ryvarden & Johansen (1980) e Vlasák *et al.*, (2011) para *F. gilva* e sugerimos a utilização do padrão de zonação como característica relevante para diferenciar *F. gilva* de outras espécies.

Desse modo, espécimes com superfície do píleo fortemente zonado devem se tratar de outras espécies que, muitas vezes, são incorretamente identificadas como *F. gilva*, conforme observado no presente estudo. Todos os espécimes de *F. callimorpha* e *F. paracallimorpha* utilizados aqui foram depositados no herbário URM como *F. gilva* (= *P. gilvus*) quando o padrão de zonação não foi levado em consideração.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que características macro- e microscópicas tradicionalmente utilizadas para identificar espécies em *Fuscoporia*, embora importantes, são ferramentas limitadas em alguns casos. Desse modo, é importante que em *Fuscoporia* novos estudos sempre contemplem análises baseadas em sequências do rDNA em conjunto com a taxonomia tradicional, a fim de conhecer a real diversidade do grupo.

4.2.7. Taxonomia morfológica e molecular de *Hymenochaete*

Hymenochaete é um dos maiores gêneros de Hymenochaetaceae e foi descrito por Lévêillé (1846) baseado em *H. rubiginosa* (Dicks.: Fr.) Lév. como tipo (WAGNER & FISCHER, 2002b). Esse gênero inclui 130 espécies (HE & LI, 2011; HE & DAI, 2012), das quais 30 são citadas para o Brasil (GIBERTONI *et al.*, 2015).

Hymenochaete abrange espécies de basidioma ressupinado, pileado a estipitado com himenóforos corticióides, lamelados ou poróides, sistema hifálico monomítico, abundantes setas himeniais e basidiosporos hialinos (cilíndricos a elipsóides). Além disso, seus representantes possuem a capacidade de causar podridão branca (PARMASTO, 1995; 2001; LÉGER, 1998; WAGNER & FISCHER, 2002b; DAI, 2010). Durante a última década, taxonomistas consideram *Hymenochaete* de nomenclatura questionável, pois muitas espécies estavam sendo descritas com base em pequenas variações morfológicas que poderiam ser, na verdade, consequência da plasticidade fenotípica de uma determinada espécie (HE & DAI, 2012; PARMASTO *et al.*, 2014).

Nas reconstruções baseadas em sequências ITS, LSU e ITS+LSU obtidas a partir de espécimes de diferentes biomas brasileiros, seis espécies de *Hymenochaete* foram delimitadas: *H. damicornis*, *H. iodina*, *H. luteobadia*, *H. microspora*, *H. resupinata* e *H. rheicolor* (Figuras 14, 15 e 16).

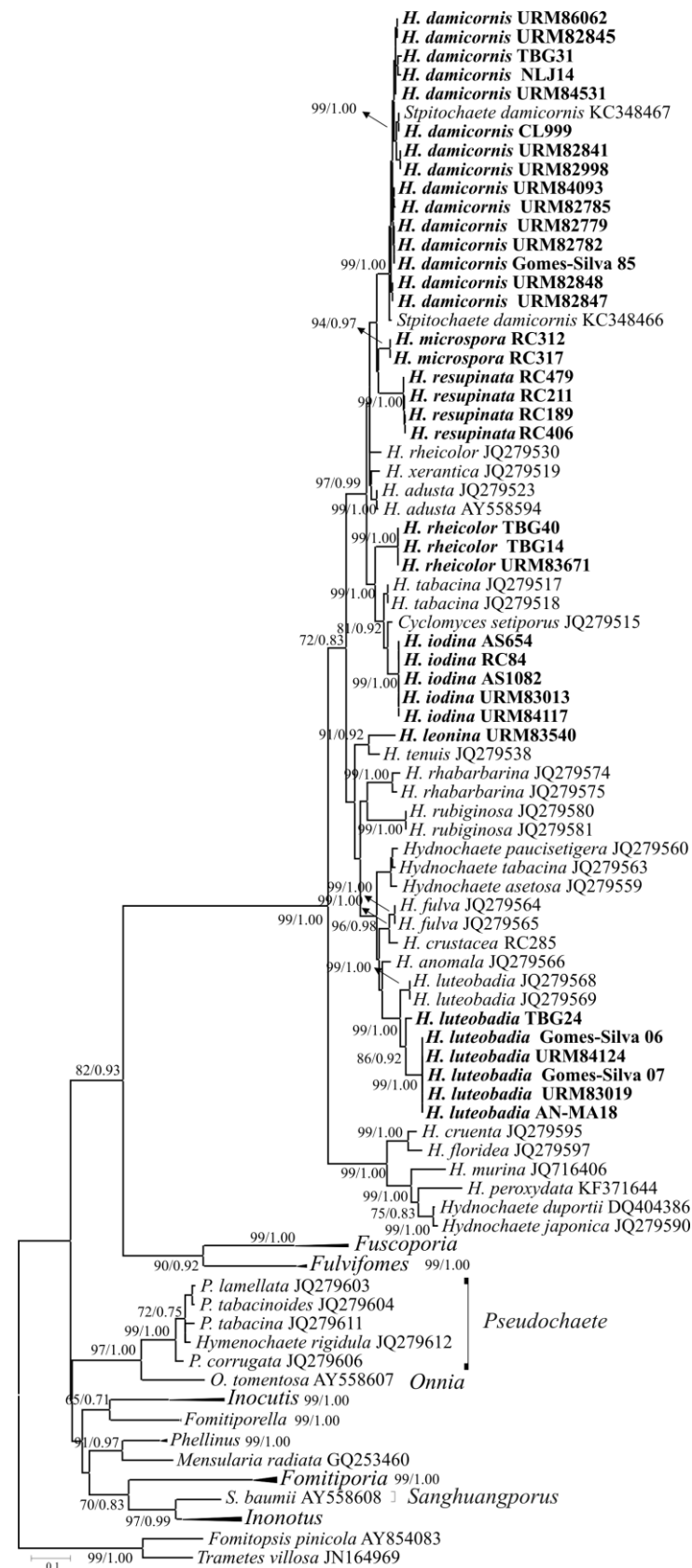
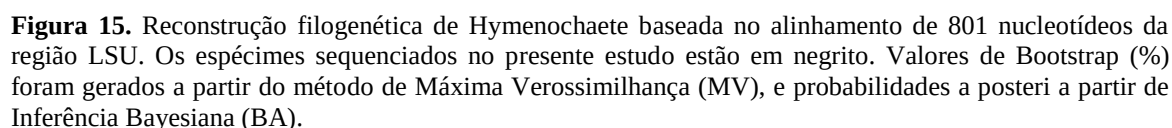


Figura 14. Reconstrução filogenética de *Hymenochaete* baseada no alinhamento de 718 nucleotídeos da região ITS. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de Bootstrap (%) foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (MV), e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA).



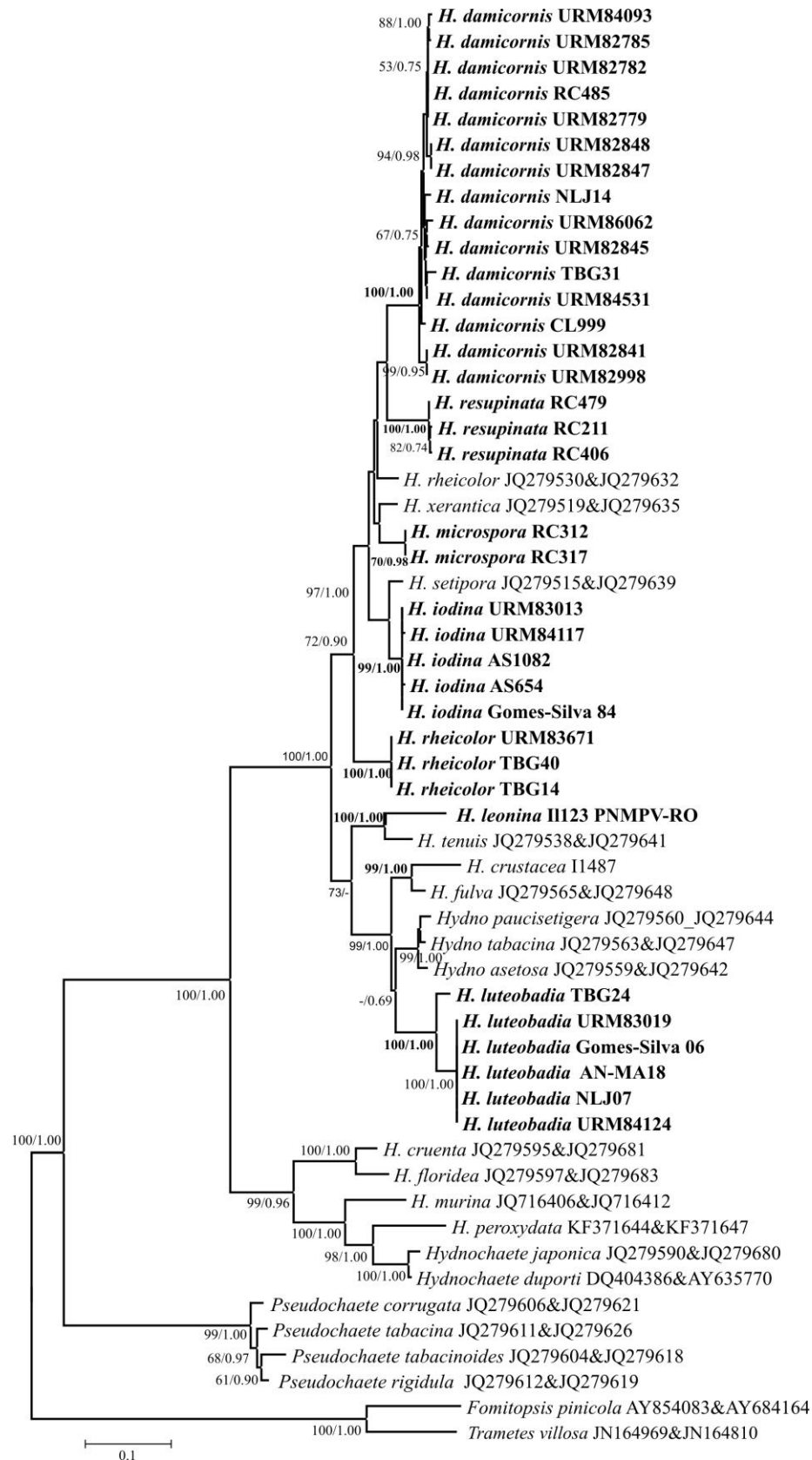


Figura 16. Reconstrução filogenética de Hymenochaete baseada no alinhamento de 1519 nucleotídeos relativos a combinação das regiões ITS e LSU. Os espécimes sequenciados no presente estudo estão em negrito. Valores de Bootstrap (%) foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (MV), e probabilidades a posteriori a partir de Inferência Bayesiana (BA).

Nas análises baseada em sequências ITS, observa-se um clado formado por 17 espécimes de *H. damicornis* que foram coletados em diferentes biomas do Brasil (Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica). Para a reconstrução baseada em sequências LSU, o mesmo agrupamento formado exclusivamente por *H. damicornis* foi observado, porém com 15 espécimes brasileiros e uma de Porto Rico, este último utilizado no clássico trabalho de Wagner & Fischer (2001).

Hymenochaete damicornis (= *Stereum damicornis* Link) é bastante comum nos neotrópicos, sendo caracterizada pelo basidioma estipitado, himênio liso, presença de setas lanceoladas (raras próximo à superfície do píleo e abundantes no himênio) e basidiosporos não amilóides, hialinos e de parede fina, medindo aproximadamente $5.5\text{--}7 \times 4\text{--}5.5 \mu\text{m}$ (RYVARDEN, 1985, as *Stipitochaete damicornis*; JOB, 1990; SOARES & GUGLIOTTA, 1998; LÉGER, 1998; PARMASTO, 2001). Os 15 espécimes brasileiros aqui estudados apresentaram características bastante similares às listadas.

Ryvarden (1985) descreveu o gênero *Stipitochaete* com duas espécies [*S. damicornis* (= *H. damicornis*) e *S. reniformis* (= *H. reniformis*)] devido à presença de basidioma estipitado. Entretanto, Parmasto (1995), ao utilizar caracteres macromorfológicos, sugeriu que *Stipitochaete* seria um gênero artificial. Posteriormente, Wagner & Fischer, 2002 (2001, 2002a, b), utilizando dados moleculares (sequências LSU), observaram que *Stipitochaete*, na verdade, pertence à *Hymenochaete*, estabelecendo assim a sinonímia entre esses gêneros.

Hymenochaete damicornis e *H. reniformis* são morfologicamente similares, sendo ambas descritas com base em espécimes do Brasil. Ryvarden (1985) mencionou que *H. reniformis* pode ser diferenciado de *H. damicornis* pela presença de uma linha negra no contexto que é ausente em *H. damicornis*. No entanto, o autor menciona que esta característica nem sempre é facilmente observada, principalmente em espécimes jovens de *H. reniformis*. Em todos os 15 espécimes de *H. damicornis* aqui analisados a presença de linha no contexto não foi observada.

De acordo com Ryvarden (1985) e Léger (1998), a principal característica que diferencia essas espécies são as setas himeniais, que são mais delgadas e longas em *H. damicornis* ($120\text{--}220 \times 8\text{--}12 \mu\text{m}$ em *H. damicornis* e $65\text{--}125 \times 12\text{--}25 \mu\text{m}$ em *H. reniformis*). No entanto, essa diferença não foi observada por Soares & Gugliotta (1998) e Parmasto (2001), conforme tabela 3.

Tabela 3. Tamanho das setas himeniais e abhimeniais de *H. damicornis* e *H. reniformis* de acordo com diferentes autores.

Referência	Setas himeniais		Setas abhimeniais	
	<i>H. damicornis</i>	<i>H. reniformis</i>	<i>H. damicornis</i>	<i>H. reniformis</i>
Ryvarden (1985)	120–220 × 8–12 (14) µm	65–125 × 12–5 µm	120–220 × 8–12 (14) µm	Probably 65–125 × 12–25 µm
Soares & Gugliotta (1998)	40–130 × 4–12 µm	80–120 × 10–15 µm	-	-
Léger (1998)	(75)100–175(200) × (7)8–15(20) µm	40–70 × 10–15 µm	30–40 × 6–9 µm	20–35 × 12–19 µm
Parmasto (2001)	90–160(-220) × 8– 15 µm	-	60–100 × 8–13 ou 40–50 × 8– 10 µm	-

Ryvarden (1985) e Léger (1998) observaram ainda a presença de setas abhimeniais em ambas as espécies. Porém, Ryvarden (1985) menciona que esse tipo de seta é raro, mas quando presente possui morfologia lanceolada em *H. reniformis* e aculeada em *H. damicornis*. No entanto, Léger (1998) comenta que setas abhimeniais são abundantes e ventricosas em *H. reniformis*, e raras e de morfologia lanceolada em *H. damicornis*. Parmasto (2001) também observou setas abhimeniais em *H. damicornis*.

Todos os espécimes de *H. damicornis* aqui analisados apresentaram setas himeniais lanceoladas, porém de tamanho variável. Os exemplares URM86062, URM82782, URM82785, URM82945 e URM82781 apresentaram setas himeniais medindo 130–150 × 8–10 µm, enquanto nos espécimes URM84093 e URM82779 são observadas setas himeniais de dois tamanhos: 130–150 × 8–10 µm e 50 × 10 µm. Setas himeniais medindo exclusivamente 50 × 10 µm foram ainda observadas no espécime URM82998. Setas abhimeniais (raras) foram vistas apenas nos exemplares URM84093 e URM82845, possuindo tamanho similar ao descrito por Parmasto (2001).

Esses resultados demonstram que a presença de setas himeniais e abhimeniais, assim como seu tamanho e forma, são características altamente variáveis em *H. damicornis*, assim como em *H. reniformis* (Tabela 3) e, desse modo, não podem ser utilizados para separar essas espécies. Todos os espécimes de *H. damicornis* aqui

estudados apresentaram as características descritas para ambas as espécies. Desse modo, a sinonímia de *H. reniformis* a *H. damicornis* é sugerida.

Em todas as análises, dois espécimes de *H. microspora* coletados em área de Mata Atlântica (RPPN Frei Caneca, Jaqueira, PE) formaram um agrupamento distinto das demais espécies do gênero, sem se agrupar com sequências disponíveis no GenBank (Figuras 14, 15 e 16). Os espécimes aqui analisados possuem setas himeniais lanceoladas ($40\text{--}55 \times 5\text{--}7 \mu\text{m}$) e basidiosporos hialinos de morfologia cilíndrica, medindo $2.5\text{--}3.0 \times 2.0\text{--}2.5 \mu\text{m}$, similares à descrição de Léger (1998). Esta espécie é caracterizada principalmente pela presença de cristais no contexto, estruturas estas ausentes no córtex (Léger 1998). Os espécimes RC312 e RC317 representam os primeiros registros para o Brasil desta espécie que até então era conhecida somente para a Colômbia e o Equador.

Nas análises ITS e ITS+LSU, um clado bem suportado foi formado exclusivamente por três espécimes de *H. resupinata* coletados no Brasil, enquanto que para as análises LSU foi formado por um espécime da Costa Rica cuja sequência foi disponibilizada por Parmasto *et al.*, (2014), além dos três espécimes brasileiros. Parmasto (2000) descreveu o gênero *Dichochaete* baseado em duas espécies (*D. setosa* e *D. ceratophora*) que compartilhavam uma característica até então só conhecida para Clavariaceae (família distantemente relacionada com Hymenochaetaceae): a presença de dicohifas. Entretanto, estudos filogenéticos baseados em sequências LSU demonstraram que *Dichochaete* pertence a *Hymenochaete*, propondo a nova combinação *H. resupinata* (= *Thelephora setosa*) (PARMASTO *et al.*, 2014). Esta espécie é caracterizada pelo basidioma pileado, superfície himenial granulada a tuberculada, dendrohiídeos ausentes e dicohifas presentes, características essas similares aos espécimes aqui analisados. No presente estudo, a combinação proposta por Parmasto *et al.*, (2014) é confirmada com a adição de espécimes brasileiros.

Para as análises a partir de sequências ITS e ITS+LSU, observou-se um clado formado por três espécimes de *H. rheicolor* (Mont.) Lév. originários do Brasil, enquanto nas análises baseadas em sequências LSU esse clado foi formado pelos mesmos três espécimes e mais um *H. rheicolor* da Guiana Francesa disponibilizado por Parmasto *et al.*, (2014). Nas análises de ITS e ITS+LSU, os espécimes brasileiros apresentaram-se distantemente relacionados de espécimes chineses também identificados como *H. rheicolor*, mas que claramente representam uma outra espécie. *Hymenochaete rheicolor* caracteriza-se pela ausência de córtex e de hiídeos incrustados no himênio. Além disso, em

todos os espécimes brasileiros também se pode observar setas himeniais lanceoladas ($60\text{--}120 \times 8\text{--}13 \mu\text{m}$) e basidiosporos hialinos, cilíndricos a elipsóides ($5\text{--}6 \times 1.8\text{--}2.5 \mu\text{m}$), similares aos descritos por Léger (1988).

Em todas as análises, os cinco espécimes de *Hymenochaete iodina* (Mont.) Baltazar & Gibertoni coletados na Amazônia brasileira formaram um clado bem delimitado com alto suporte estatístico (ITS: MV 99% e BA 1.00; LSU: MV 93% e BA 0.95; ITS+LSU: MV 99% e BA 1.00), conforme figuras 14, 15 e 16. De acordo com Ryvar den (2004, como *Cyclomyces iodin*), essa espécie é caracterizada pela presença de linha negra no contexto, setas himeniais abundantes e de ápice agudo ($25\text{--}60 \times 4\text{--}7 \mu\text{m}$) e basidiosporos hialinos, cilíndricos a elipsóides ($3.5\text{--}4 \times 2\text{--}2.5 \mu\text{m}$). Todos os espécimes brasileiros são morfológicamente similares à descrição de Ryvar den (2004). A combinação *H. iodina* proposta por Gomes-Silva *et al.*, (2012) com base em dados morfológicos foi confirmada, porém com evidências moleculares.

As seis sequências ITS e LSU de *H. luteobadia* (Fr.) Höhn. & Litsch. geradas no presente estudo agruparam-se em todas as análises com *H. luteobadia* proveniente da China. Esta espécie possui distribuição pantropical e é caracterizada principalmente pela presença de córtex e de uma linha escura no contexto, além de apresentar hifídios. Essa espécie possui ainda setas himeniais lanceoladas com $39\text{--}45 \times 8.5\text{--}9 \mu\text{m}$ (LÉGER, 1988), características observadas nos espécimes aqui analisados. Nesses espécimes, basidiosporos não foram visualizados, porém de acordo com Léger (1988) e Parmasto (2001), eles são hialinos e elipsóides, medindo $4.0\text{--}5.5 \times 1.8\text{--}2.5 \mu\text{m}$. Macroscopicamente *H. luteobadia* é similar a *H. rheicolor*, mas essa não possui hifídios incrustados no himênio. Os resultados encontrados no presente trabalho mostram que essa característica é relevante para diferenciar essas espécies do ponto de vista morfológico (Figuras 14, 15 e 16).

Em todas as análises, *Hymenochaete leonina* Berk. & M.A. Curtis agrupou-se com um espécime de *Hymenochaete tenuis* Peck da China, porém apresentando-se como espécie distinta. *Hymenochaete leonina* é amplamente conhecida para o Brasil (GOMES-SILVA *et al.*, 2012) e caracteriza-se pelo distinto córtex encontrado em meio ao contexto (JOB, 1990; LÉGER, 1998; PARMASTO, 2001). Além disso, representantes desta espécie possuem setas himeniais lanceoladas ($40\text{--}90 \times 5\text{--}14 \mu\text{m}$) e basidiosporos hialinos e cilíndricos, medindo $3.8\text{--}5.5 \times 1.8\text{--}3.2 \mu\text{m}$, características estas também observadas no espécime URM83540. Embora *Hymenochaete tenuis* possua basidiosporos de tamanho similar, além de setas himeniais ligeiramente menores ($25\text{--}60 \times 6\text{--}12 \mu\text{m}$), essa espécie

não apresenta córtex, característica que pode ser observada em *Hymenochaete leonina* (LÉGER, 1998; PARMASTO, 2001).

5. CONCLUSÕES

- É possível a obtenção de DNA genômico a partir de exemplares herborizados de Hymenochaetaceae, embora a extração resulte em produtos de menor qualidade em relação aos obtidos de amostras frescas.
- Para os gêneros aqui estudados de Hymenochaetaceae, é fundamental a utilização de sequências de DNA em conjunto com dados morfológicos para delimitação de espécies já descritas e novas combinações, assim como para descrever novas espécies para a ciência.
- Para os táxons analisados, as sequências de LSU separadamente são úteis no delineamento de espécies. No entanto, para o complexo *Fomitiporia langloisii*, essa região isoladamente apresentou resolução limitada.
- Embora úteis, os atuais dados micro-macromorfológicos utilizados na identificação de membros de Hymenochaetaceae apresentaram-se como ferramentas limitadas para algumas espécies de *Fulvifomes*, *Fuscoporia*, *Hymenochaete*, *Phellinotus* e *Phellinus*.
- Espécies crípticas em Hymenochaetaceae podem ser identificadas a partir de sequências ITS e/ou LSU.
- Em *Fuscoporia*, o padrão de zonação da superfície abhimenial é uma característica importante para diferenciação de *F. gilva* em relação a *F. callimorpha* e *F. paracallimorpha*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMALFI, M.; YOMBIYENI, P.; & DECOCK, C. 2010. *Fomitiporia* in sub-Saharan Africa: Morphology and multigene phylogenetic analysis support three new species from the Guineo-Congolian rainforest. *Mycologia* 102:1303–1317.
- AMALFI, M.; RAYMUNDO, T.; VALENZUELA, R.; & DECOCK, C. 2012. *Fomitiporia cupressicola* sp. nov., a parasite on *Cupressus arizonica*, and additional unnamed clades in the southern USA and northern Mexico, determined by multilocus phylogenetic analyses. *Mycologia* 104: 880–893.
- AMALFI, M. & DECOCK, C. 2013. *Fomitiporia castilloi* sp. nov. and evidence for multiples clades around *F. apiahyana* in Meso- and South America, representing potential species. *Mycologia* 105: 873–887.
- AMALFI, M.; ROBLEDO, G.; & DECOCK, C. 2014. *Fomitiporia baccharidis* comb. nov., a little known species from high elevation Andean forests and its affinities within the neotropical *Fomitiporia* lineages. *Mycol Progress* 13: 1075–1087.
- AMORIM, D.S. 2002. Fundamentos de Sistemática Filogenética. Ribeirão Preto: Editora Holos.
- ARNOT, D.E.; ROPER, C.; & BAYOUMI, R.A. 1993. Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Mol Biochem Parasitol* 61(1):15–24.
- BAE, J.S.; JANG, K.H.; & JIN, A. 2005a. Polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* enhances dermal wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. vet. Sci* 6: 161–164.
- BAE, J.S.; JANG, K.H.; YIM, H.; & JIN, H.K. 2005b. Polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* inhibit melanoma growth in mice. *Cancer Letters* 218: 43–52.
- BALASUNDARAM, S.V.; ENGH, I.B.; SKREDE, I.; & KAUSERUD, H. 2015. How many DNA markers are needed to reveal cryptic fungal species? *Fungal Biology* 119: 940–945.
- BALTAZAR, J.M.; TRIERVEILER-PEREIRA, L.; LOGUERCIO-LEITE, C.; & RYVARDEN, L. 2009. Santa Catarina Island mangroves 3: a new species of *Fusconia*. *Mycologia* 101: 859–863.
- BALTAZAR, J.M.; PILDAIN, M.B.; GORJÓN, S.P.; SILVEIRA, R.M.B.; & RAJCHENBERG, M. 2014. Phylogenetic relationships of *Hydnum peroxydatum*

- support the synonymy of *Hydnochaete* with *Hymenochaete* (Hymenochaetaceae, Agaricomycetes). *Mycologia* 106: 323–327.
- BEGEROW, B; NILSSON, H; UNTERSEHER, M; & MAIER, W. 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 99–108.
- BLACKWELL, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98(3): 426–438.
- BRUNS, T. D.; FOGEL, R.; & TAYLOR, J. W. 1990. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. *Mycologia* 82: 175–184.
- CAMPOS-SANTANA, M.; AMALFI, M.; ROBLEDO, G.; SILVEIRA, R.M.B.; & DECOCK, C. 2014. *Fomitiporia neotropica*, a new species from South America evidenced by multilocus phylogenetic analyses. *Mycol Progress* 13: 601–615.
- CAMPOS-SANTANA, M.; ROBLEDO, G.; DECOCK, C.; & SILVEIRA, R.M.B. 2015. Diversity of the Poroid Hymenochaetaceae (Basidiomycota) from the Atlantic Forest and Pampa in Southern Brazil. *Cryptogamie, Mycologie* 36(1):43–78.
- CHASE, M.W.; COWAN, R.S.; HOLLINGSWORTH, P.M.; VAN DEN BERG, C.; MADRIÑÁN, S.; PETERSEN. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56: 295–299.
- CORNER, E.J.H. 1948. *Asterodon*, a clue to the morphology of fungus fruit-bodies: with notes on *Asterostroma* and *Asterostromella*. Transactions of the British Mycological Society. 31(3-4): 234–245.
- CORNER, E.J.H. 1991. Ad Polyporaceas VII. Beihefte zur Nova Hedwigia 101: 1–175.
- CUNNINGHAM, G. 1947. Notes on the classification of the Polyporaceae. New Zealand Journal of Science and Technology 28A: 238–251.
- DAI, Y.C. 1995. Changbai wood-rotting fungi 3. The genus *Phellinidium* (basidiomycetes) and a new species, *P. aciferum*. *Annales Botanici Fennici* 32: 63–73.
- DAI, Y.C. 1999. *Phellinus* sensu lato (Aphylliphorales, Hymenochaetaceae) in East Asia. *Acta Botanica Fennica* 166: 1–115.
- DAI, Y.C.; CUI, B.K.; & DECOK, C. 2008. A new species of *Fomitiporia* (Hymenochaetaceae, Basidiomycota) from China based on morphological and molecular characters. *Mycological Research* 112: 375–380.
- DAI, Y.C. 2010. Hymenochaetaceae (Basidiomycota) in China. *Fungal Diversity* 45(1): 131–343.

- DARRIBA D, *et al.* 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9:772.
- DAVID, A.; & RAJCHENBERG, M. 1985. Pore fungi from French Antilles and Guiana. *Mycotaxon* 22(2): 285–325.
- DECOCK, C.; FIGUEROA, S.H.; ROBLEDO, G. & CASTILLO, G. 2006. *Phellinus caribaeo-quercicolus* sp. nov., parasitic on *Quercus cubana*, taxonomy and preliminary phylogeny. *Mycologia* 98:265–274.
- DECOCK, C.; FIGUEROA, S.H.; ROBLEDO, G.; CASTILLO, G. 2007. *Fomitiporia punctata* (Basidiomycota, Hymenochaetales) and its presumed taxonomic synonyms in America: taxonomy and phylogeny of some species from tropical/subtropical areas. *Mycologia* 99:733–752.
- DENTINGER, B.T.M.; MARGARITESCU, S.; & MONCALVO, J.M. 2010. Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. *Molecular Ecology Resources* 10: 628–633.
- DOMANSKI, S., ORLOS, H. & SKIRGIELLO, A. 1973. Fungi. Polyporaceae II (pileatae) Mucronoporaceae II (pileatae), Ganodermataceae, Bondarzewiaceae, Boletopsidaceae, Fistulinaceae. Foreign Scientific Publications, Warsaw.
- DONG, W.; NING, L.; WEI-DONG, L.; CUI-CUI, L.; CHEN, R.P; & XIAO, J. 2009. Tumor-inhibitory and liver-protective effects of *Phellinus igniarius* extracellular polysaccharides. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 633–638.
- DONK, M.A. 1931. Revisie van de Nederlandse Heterobasidiomyceteae (uitgezonderd Uredinales en Ustilaginales) en Homobasidiomyceteae—Aphyllloporaceae. Deel I. Meded. Ned. Mycol. Ver. 18–20, 65–200.
- DONK, M.A. 1933. Revision der Niederlandischen Homobasidiomyceten-Aphyllloporaceae II. Meded Bot. Mus. Herb. Univ. Utercht 9: 1–278.
- DONK, M.A. 1948. Notes on Malesian fungi 1. *Bull Bot Gard Buitenzorg* III 17: 473–482.
- 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 Divers.* 42: 71–78.
- DRECHSLER-SANTOS, E.R.; ROBLEDO, G.; LIMA-JÚNIOR, N.C.; MALOSSO, E.; GIBERTONI, T.B.; CAVALCANTI, M.A.Q.; & RAJCHENBERG, M. 2016. *Phellinotus* gen. nov., a new Neotropical piece in the Poroid Hymenochaetaceae Phylogeny. *Phytotaxa* 261: 218–239.

- FALEIRO, F.G. 2007. *Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. EMBRAPA, p 17–34.
- FELSENSTEIN, J. 2004. *Inferring Phylogenies*. Sunderland: Sinauer Associates.
- FERES, F.; SOUZA, A.P.; AMARA, M.C.E.; & BITTRICH, V. 2005. Avaliação de métodos de preservação de amostras de plantas de savanas neotropicais para a obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. *Revista Brasileira de Botânica* 28(2): 277–283.
- FIASSON, J. L. 1982; Distribution of styrylpyrones in the basidiocarps of various Hymenochaetaceae (Aphyllophorales, Fungi). *Biochemical Systematics & Ecology* 10: 289–296.
- FIASSON, J. L.; & NIEMELÄ, T. 1984. The Hymenochaetales: a revision of the European poroid taxa. *Karstenia* 24: 14–28.
- FIDALGO, O.; & BONONI, V.L.R. 1989. Fungos e líquens macroscópicos. In: Fidalgo, O; Bononi, V.L.R. (coord.). *Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico*. Instituto de Botânica: São Paulo.
- FISCHER, M. 1996. On the species complexes within *Phellinus*: *Fomitiporia* revisited. *Mycological Research* 100: 1459–1467.
- FUNGARO, M.H.P. *PCR na Micologia*. 2000. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento 14: 12–16.
- GEML, J.; TULLOSS, R.E.; LAURSEN, G.A.; SAZANOVA, N.A.; & TAYLOR, D.L. 2008. Evidence for strong inter- and intracontinental phylogeographic structure in *Amanita muscaria*, a Wind-dispersed ectomycorrhizal basidiomycete. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 694–701.
- GIBERTONI, T.B.; GOMES-SILVA, A.C.; CHIKOWSKI, R.S.; LIRA, C.R.S.; SOARES, A.M.S.; ... & MONTROYA, C.A.S. 2015. Hymenochaetales in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Retrieved from <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB92352>.
- GÓES-NETO, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; & GUERRERO, R.T. 2002. Molecular phylogeny of tropical *Hymenochaetales* (Basidiomycota). *Mycotaxon* 84: 337–354.
- GÓES-NETO, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; & GUERRERO, R.T. 2005. DNA Extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: perform of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas* 18(2): 19–32.

- GÓES-NETO, A. 2007. Amostragem de fungos para estudos de filogenia molecular e código de barras de DNA. In: L.C., Maia; E, Malosso; & A.M., Yano-Melo (orgs). *Micologia: avanços no conhecimento*. Livros de Resumos do V Congresso Brasileiro de Micologia. Ed. Universitária da UFPE, Recife. 197–201.
- GOMES-SILVA, A.C.; RYVARDEN, L.; & GIBERTONI, T.B. 2009. New and interesting species of Hymenochaetaceae from the Brazilian Amazonia. *Mycological Progress* 8: 273–279.
- GOMES-SILVA, A.C.; BALTAZAR, J.M.; & GIBERTONI, T.B. 2012. *Coltricia* and *Hymenochaete* (Hymenochaetaceae) from the Amazonia and the Atlantic Forest, Brazil: One new combination and new records. *The Journal of the Torrey Botanical Society* 139: 428–436.
- GOMES-SILVA, A.C.; RYVARDEN, L.; & GIBERTONI, T.B. 2012. Two new species of *Phellinus* s.l. from the Brazilian Amazonia. *Phytotaxa* 67: 55–60.
- GOMES-SILVA, A.C.; RYVARDEN, L.; & GIBERTONI, T.B. 2013. *Inonotus amazonicus* sp. nov., *I. calcitratus* comb. nov. and notes on *Phylloporia* (Hymenochaetaceae, Agaricomycetes) from the Brazilian Amazonia. *Mycoscience* 54: 116–121.
- GORAB, E. 2012. Evolução dos genes nucleares de RNA ribossômico. In: *Biologia molecular e evolução*, 2ª edição, cap. 8. Editores: Mاتيoli & Fernandes. Holos Editora, Sociedade Brasileira de Genética.
- GROPOSO, C.; LOGUERCIO-LEITE, C.; & GÓES-NETO, A. 2007. *Fuscoporia* (Basidiomycota, Hymenochaetales) in Southern Brazil. *Mycotaxon*, 101 (1): 55–63.
- SOARES, S.C.S; & GUGLIOTTA, A.M. 1998. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Fungos*, 7: Aphyllophorales (Hymenochaetaceae). *Hoehnea* 25(1): 11–31.
- HAJIBABAEI, M. & SINGER, G.C.A.; HEBERT, P.D.N.; HICKEY, D.A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23(4): 167–172.
- HALLING, R.E.; OSMUNDSON, T.W; & NEVES, M.A. 2008. Pacific boletes: Implications for biogeographic relationships. *Mycological Research* 112: 437–447.
- HANSEN, L.; & KNUDSEN, H. 1997. Nordic Macromycetes. Vol. 3. Heterobasidioid, aphyllophoroid and gastromycetoid basidiomycetes. Nordsvamp, Copenhagen.

- HATTORI, T.; SAKAYAROJ, J.; JONES, E.B.G.; SUETRONG, S.; PREEDANON, S.; & KLAYSUBAN, A. 2014. Three species of *Fulvifomes* (Basidiomycota, Hymenochaetales) associated with rots on mangrove tree *Xylocarpus granatum* in Thailand. *Mycoscience* 55: 344–354.
- HE, S.H.; & LI, H.J. 2011. *Hymenochaete* in China. 2. A new species and three new records from Yunnan Province. *Mycotaxon* 118:411–422.
- HE, S.H.; & DAI, Y.C. 2012. Taxonomy and phylogeny of *Hymenochaete* and allied genera of Hymenochaetaceae (Basidiomycota) in China. *Fungal Diversity* 56:77–93.
- HEINRICHS, J.; KREIER, H.P.; FELDBERG, K.; SCHMIDT, A.R.; ZHU, R.L.; SHAW, B.; SHAW, A.J.; & WISSEMAN, V. 2011. Formalizing morphologically cryptic biological entities: new insights from DNA taxonomy, hybridization, and biogeography in the leafy liverwort *Porella platyphylla* (Jungermanniopsida, Porellales). *Am J Bot* 98(8): 1252–1262.
- HERBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; & WAARD, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270: 313–321.
- HIBBETT, D.S. *et al.*, 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res.* 111: 509–47.
- HIBBETT, D.S.; OHMAN, A.; GLOTZER, D.; NUHN, M.; KIRK, P.; & NILSSON, R.H. 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews* 25 (1): 38–47.
- HUANG, H.Y.; CHIEH, S.Y.; TSO, T.K.; CHIEN, T.Y.; LIN, H.T.; & TSAI, Y.C. 2011. Orally administered mycelia culture of *Phellinus linteus* exhibits antitumor effects in hepatoma cell-bearing mice. *J Ethnopharmacol.* 133:460–466.
- INSUMRAN, Y.; KLINHOM, U.; & PRAMUAL, P. 2012. Variability of internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences of *Fuscoporia gilva* and *Fuscoporia* sp. in Thailand. *Czech Mycology* 64(1): 55–64.
- JAHN, H. 1981. Die resupinaten *Phellinus*-Arten in Mitteleuropa mit Hinweisen auf die resupinaten *Inonotus*-Arten und *Poria expansa* (Desm.) [= *Polyporus megaloporus* Pers.]. *Bibliotheca Mycologica* 81: 37–151.
- JAMES, T.Y. *et al.* 2006. Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature* 443: 818–822.

- JANG, B.S.; KIM, J.C.; & BAE, J.S. 2004. Extratcs of *Phellinus gilvus* and *Phellinus baumii* inhibit pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide in rats. *Biotechnol. Lett* 26: 31–33.
- JANZEN, D.H. *et al*, 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources* 9 (Suppl. 1): 1–26.
- JOB, D.J. 1990. Le genre *Hymenochaete* dans le zone tempérées de l’hémispère sud. *Mycol Helvet* 4: 1–51.
- KIM, H.Y.; YOON, D.H.; LEE, W.H.; HAN, S.K.; SHRESTHA, B.; KIM, C.H.; LIM, M.H.; CHANG, W.; LIM, S.; CHOI, S.; SONG, W.O.; SUNG, J.M.; HWANG, K.C.; & KIM, T.W. 2007. *Phellinus linteus* inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF- κ B and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage. *J Ethnopharmacol* 114:307–315.
- KIRK, P.M.; Cannon, P.F.; Minter, D.W.; & Stalpers, J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10^o Ed, CAB International.
- KRESS, W.J.; WURDACK, K.J.; ZIMMER, E.A.; WEIGT, L.A.; & JANZEN, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS* 102 (23): 8369–8374.
- LAMROOD, P.; & GÓES-NETO, A. 2006. Taxonomic studies on Indian *Phellinus* s.l. species: parsimony analysis using morphological characters. *Mycotaxon* 95: 117–131.
- LARKIN, M.A. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
- LARSEN, M.J.; COBB-POULLE, L.A. 1990. *Phellinus* (Hymenochaetaceae) Synopsis Fungorum 3. Oslo: FungiFlora. 206 p.
- LARSSON, K.H.; PARMASTO, E.; FISCHER, M.; LANGER, E.; NAKASONE, K.K.; & REDHEAD, S.A. 2006. Hymenochaetales: a molecular phylogeny for the hymenochaetoid clade. *Mycologia* 98(6): 926–936.
- LARSSON, K.H. Re-thinking the classification of corticioid fungi. *Mycol Res* 111 (9):1040-1063, 2007.
- LÉGER, J.C. 1998. Le genre *Hymenochaete* Lévillé. *Bibl Mycol* 171:1–319, 1998..
- LÉVEILLÉ, J.H. 1846. Descriptions de champignons de l’herbier du Muséum de Paris. *Ann Sci Nat Bot* III 5:111–167.
- LI, G.; KIM, D. H.; KIM, T. D.; PARK, B. J.; PARK, H. D.; & PARK, J. I. 2004. Proteinbound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells. *Cancer Letters* 216: 175–181.

- LI, Y.G.; JI, D.F.; ZHONG, S.; ZHU, J.X.; CHEN, S.; & HU, G.Y. 2011. Anti-tumor effects of proteoglycan from *Phellinus linteus* by immunomodulating and inhibiting Reg IV/EGFR/Akt signalling pathway in colorectal carcinoma. *Int J Biol Macromol.* 48:511–517.
- LIMA-JÚNIOR, N.C.; GIBERTONI, T.B.; & MALOSSO, E. (2014) Delimitation of some neotropical laccate *Ganoderma* (Ganodermataceae): molecular phylogeny and morphology. *Rev Biol Trop* 62(3): 1197–1208.
- LOGUERCIO-LEITE, C., & WRIGHT, J. E. (1995) The genus *Phellinus* (Hymenochaetaceae) on the Island of Santa Catarina, Brazil. *Mycotaxon* 54: 361–388.
- LU, T.L.; HUANG, G.J.; LU, T.J.; WU, J.B.; WU, C.H.; YANG, T.C.; IIZUKA, A.; & CHEN, Y.F. 2009. Hispolon from *Phellinus linteus* has antiproliferative effects via MDM2-recruited ERK1/2 activity in breast and bladder cancer cells. *Food Chem Toxicol* 47(8): 2013–21.
- MATHENY, P.B.; LIU, Y.J.; AMMIRATI, J.F.; & HALL, B.D. 2002. Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (Inocybe, Agaricales). *American Journal of Botany* 89(4): 688–698.
- MATHENY, P.B. 2005. Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (Inocybe; Agaricales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 1–20.
- MATHENY, P.B. *et al.* 2007. Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 430–451.
- MATIOLI, S.R.; & PASSOS-BUENO. 2012. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: *Biologia molecular e evolução*, 2ª edição, cap. 19. Editores: Matioli & Fernandes. Holos Editora, Sociedade Brasileira de Genética.
- MONCALVO, J.M.; & BUCHANAN, P.K. 2008. Molecular evidence for long distance dispersal across the Southern Hemisphere in the *Ganoderma applanatum-australe* species complex (Basidiomycota). *Mycological Research* 425–436.
- MURRILL, W.A. 1914. Northern polypores. Privately printed, New York.
- NILSSON, R.H.; KRISTIANSSON, E.; RYBERG, M.; HALLENBERG, N.; & LARSSON, K.H. 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics* 4: 193–201.

- NÍÑEZ, M.; & RYVARDEN, L. 2000. East Asian polypores 1. Synopsis Fungorum 13: 1–168.
- OBERWINKLER, F. 1977. Das neue System der Basidiomyceten. In: Frey W, Hurka H, Oberwinkler F, eds. Beiträge zur Biologie der niederen Pflanzen. Stuttgart, Germany: Gustav Fischer. p 59–105.
- PARMASTO, E. 1995. The genus *Hymenochaete* (Hymenomycetes): infrageneric classification and satellite genera. *Doc Mycol* 25(98–100): 305–315.
- PARMASTO, E. 2000. New taxa and new combinations in hymenochaetoid fungi (Hymenomycetes). *Folia Cryptog Estonica* 37: 55–66.
- PARMASTO, E. 2001. Hymenochaetoid fungi (Basidiomycota) of North America. *Mycotaxon* 79:107–176.
- PARMASTO, E.; SAAR, I.; LARSSON, E.; & RUMMO, S. 2014. Phylogenetic taxonomy of *Hymenochaete* and related genera (Hymenochaetales). *Mycol Progress* 13: 55–64.
- PATOUILLARD, N. 1990. Essai taxinomique sur les familles et les genres des Hyménomycetes. Paris: université de Paris.
- PEČNIKAR, F.Z.; & BUZAN, E.V. 2014. 20 years since the introduction of DNA barcoding: from theory to application. *J Appl Genetics* 55: 43–52.
- PILÁT, A. 1936–1942. Polyporaceae. In Atlas des Champignons de l'Europe (C. Kavina & A. Pilát, eds): 311–624. Prague.
- PIRES, R.M.; MOTATO-VASQUEZ, V.; GUGLIOTTA, A.M. 2015. *Fuscoporia atlantica* sp nov., a new polypore from the Brazilian Atlantic Rainforest. *Mycotaxon*, 130(3): 843-855.
- PUILLANDRE, N.; BOUCHET, P.; BOISSELIER-DUBAYLE, M.C.; BRISSET, J.; BUGE, B.; CASTELIN, M.; CHAGNOUX, S.; CHRISTOPHE, T.; CORBARI, L.; LAMBOURDIÈRE, J.; LOZOUET, P.; MARANI, G.; RIVASSEAU, A.; SILVA, N.; TERRY, Y., TILLIER, S.; UTGE, J.; & SAMADI, S. 2012. New taxonomy and old collections: integrating DNA barcoding into the collection curation process. *Mol Ecol Resour* 12: 396–402.
- RAJCHENBERG, M.; PILDAIN, M.B.; BIANCHINOTTI, M.V; & BARROETAVEÑA, C. 2015. The phylogenetic position of poroid Hymenochaetaceae (Hymenochaetales, Basidiomycota) from Patagonia, Argentina. *Mycologia* 107(4):754–67.
- RATNASINGHAM, S.; & HEBERT, P.D.N. 2007. bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes* 7: 355–364.

- RAYMUNDO, T.; VALENZUELA, R.; BAUTISTA-HERNÁNDEZ, S.; ESQUEDA, M.; CIFUENTES, J.; & PACHECO, L. 2013. The genus *Fuscoporia* (Hymenochaetales, Basidiomycota) in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 50–69.
- REID, D.A. (1975) Type studies of the larger Basidiomycetes described from South Africa. *Contr Bolus Herb* 7: 1–255.
- ROGERS, S.O.; & BENDICH, A.J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium, and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology* 5: 69–76.
- ROGERS, S.O. 1994. Phylogenetic and taxonomic information from herbarium and mummified DNA. In: Miller, J.S.; Golenberg, E.m.; Adams, J.E. (eds). Conservation of plant genes II: utilization of ancient and modern DNA. Monographs in Systematic Botany 48, Missouri Botanical Garden, St. Louis, USA. pp 47–67.
- RONQUIST, F.; & HUELSENBECK, J.P. 2003. MRBAYES 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- RYLEY, R. *et al.* 2014. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(27): 9923–8.
- RYVARDEN, L.; & JOHANSEN, I. 1980. A preliminary polypore flora of east Africa. Oslo: Norway: Fungiflora 636 p.
- RYVARDEN, L. 1982. The genus *Hydnochaete* Bres. (Hymenochaetaceae). *Mycotaxon* 15:425–447.
- RYVARDEN, L. 1985. *Stipitochaete* gen. nov. (Hymenochaetaceae, Basidiomycotina). *Trans Brit Mycol Soc* 85: 535–539.
- RYVARDEN, L.; & GILBERTSON, R. L. 1994. European polypores. Part 2: Synopsis Fungorum. Oslo: Fungiflora.
- RYVARDEN, L. 1991. Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. *Synopsis Fungorum* 5: 1–363.
- RYVARDEN, L. & GILBERTSON, R. L. 1993–94. European polypores. Vols 1–2. Fungiflora, Oslo.
- RYVARDEN, L. 2004. *Neotropical Polypores*. Part 1. Synopsis Fungorum 19, Fungiflora, Oslo.
- SCHOCH, C.L. *et al.*, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 6241–6246.

- SCHLÖTTERER, C. 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5: 63–69.
- SCHNEIDER, H. 2007. *Métodos de Análise Filogenética: Um Guia Prático*. 2ª edição. Ribeirão Preto. Editora e Sociedade Brasileira de Genética pp 13–15.
- SCHULMAN, A.H. 2007. Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158: 313–321.
- SEIFERT, K.A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 1: 83–89.
- SINGER, G.A.C. & HAJIBABAEI, M. 2009. Barcode.org: web-based molecular biodiversity analysis. *BMC Bioinformatics* 10(Suppl 6):S14.
- SOLFERINI, V.N.; & SCHEEPMAKER, D.S. 2012. Polimorfismos de isozimas. In: *Biologia molecular e evolução*, 2ª edição, cap. 19. Editores: Mاتيoli & Fernandes. Holos Editora, Sociedade Brasileira de Genética.
- SWOFFORD, D. L. (2002). PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sunderland, 1–142.
- STADEN, R.; BEAL, K.F.; & BONFIELD, J.K. The Staden Package. 1998. Computer Methods in Molecular Biology. *Bioinformatics Methods and Protocols* 132: 115–130.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; & KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- TAUTZ, D. 2000. Evolution of transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev* 10(5): 575–579.
- TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R.H.; VOGLER, A.P. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol* 18: 70–74.
- TAYLOR, D.L.; HOLLINGSWORTH, T.N.; MCFARLAND, J.W.; LENNON, N.J.; NUSBAUM, C. & RUESS, R. 2014. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. *Ecological Monographs* 84(1): 3–20.
- TEIXEIRA, A.R. 1995. Método para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos. Manual nº 6, Instituto de Botânica, São Paulo.
- TIAN, X.M.; YU, H.Y.; ZHOU, L.W.; DECOCK, C.; VLASÁK, J.; & DAI, Y.C. 2013. Phylogeny and taxonomy of the *Inonotus linteus* complex. *Fungal Diversity* 58: 159–169.

- VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; RODRIQUES, C.; SILVA PEREIRA, C.; DIJKSTERHUIS, J.; SEIFERT, K.A. JACOBS, K.; & SAMSON, R.A. 2013. Five new *Penicillium* species in section *Sclerotiora*: a tribute to the Dutch Royal family. *Persoonia* 31: 42–62.
- WAGNER, T., & FISCHER, M. 2001. Natural groups and a revised system for the European poroid *Hymenochaetales* (*Basidiomycota*) supported by nLSU rDNA sequence data. *Mycological Research* 105 (7): 773–782.
- WAGNER, T., & FISCHER, M. (2002a). Classification and phylogenetic relationships of *Hymenochaete* and allied genera of the Hymenochaetales, inferred from rDNA sequence data and nuclear behaviour of vegetative mycelium. *Mycological Progress* 1(1): 93–104.
- WAGNER, T., & FISCHER, M. 2002b. 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.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; & TAYLOR, J.W. 1990. *Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis, MA; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York, 315–322.
- YANG, Z.L. Molecular techniques revolutionize knowledge of basidiomycete evolution. 2011. *Fungal Diversity* 50: 47-58.
- YOMBIYENI, P.; DOUANLA-MELI, C.; AMALFI, M.; & DECOK, C. 2010. Poroid Hymenochaetaceae from Guineo-Congolian rainforest: *Phellinus gabonensis* sp. nov. from Gabon-taxonomy and phylegenetic relationships. *Mycology Progress* 10: 351-362.
- ZHOU, L.W. 2014. *Fulvifomes hainanensis* sp. nov. and *F. indicus* comb. nov. (Hymenochaetales, Basidiomycota) evidenced by a combination of morphology and phylogeny. *Mycoscience* 55: 70-77.