



**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS EM *GANODERMA* P. KARST.
(BASIDIOMYCOTA) BASEADAS EM SEQUÊNCIAS DO DNA RIBOSSOMAL**

NELSON CORREIA DE LIMA JÚNIOR

**RECIFE
FEVEREIRO, 2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS EM *GANODERMA* P. KARST.
(BASIDIOMYCOTA) BASEADAS EM SEQUÊNCIAS DO DNA RIBOSSOMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Aplicada

Aluno: Nelson Correia de Lima Júnior

Orientador: Dra. Elaine Malosso

**Co-orientador: Dra. Tatiana Baptista
Gibertoni**

RECIFE

FEVEREIRO, 2012

Lima Júnior, Nelson Correia de
Relações filogenéticas em *Ganoderma* P. Karst (Basidiomycota)
baseadas em sequencia do DNA ribossomal/ Nelson Correia de Lima Júnior.
– Recife: O Autor, 2012.

69 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Elaine Malosso

Coorientadora: Tatiana Baptista Gibertoni

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2012.**

Inclui bibliografia

- 1. Genética de microrganismos 2. Filogenia 3. Basidiomycetes I.
Malosso, Elaine II. Gibertoni, Tatiana Baptista III. Título.**

579.135

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-124

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS EM *GANODERMA P. KARST.*
(BASIDIOMYCOTA) BASEADAS EM SEQUÊNCIAS DO DNA RIBOSSOMAL**

NELSON CORREIA DE LIMA JÚNIOR

Data da defesa: 15 de fevereiro de 2012

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dra. Elaine Malosso – (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Adriana de Mello Gugliotta
Instituto de Botânica de São Paulo - SP

Dr. Aristóteles Góes-Neto
Universidade Estadual de Feira de Santana - BA

“E todo dia que não se haja dançado, pelo menos uma vez, seja para nós perdido! E toda verdade que não nos traga ao menos um riso nos pareça verdade falsa.”

(Friedrich Nietzsche)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me proporcionado essa experiência única de amadurecimento pessoal e acadêmico, além de ter colocado novamente pessoas certas em meu caminho.

A minha família, por toda compreensão e paciência. Em especial, minha mãe Riselma Fonseca de Medeiros Lima, minha irmã Emyliane Maria de Medeiros Lima, minhas tias Rosilma Rosal e Risolene Fonseca, além da minha avó Eurides Fonseca Lira.

A minha orientadora Dra. Elaine Malosso, pela confiança, respeito e por todos os ensinamentos prestados. Espero ter correspondido as expectativas.

A minha co-orientadora Dra. Tatiana Baptista Gibertoni, pela atenção, dedicação e apoio na execução deste trabalho. Obrigado pela confiança nos estudos moleculares relativos à Basidiomycota.

A MSc. Allyne Chrystina Gomes Silva, pela amizade e imensa colaboração nas identificações dos materiais, sempre se apresentando disposta a ajudar.

Ao prof^o e amigo Dr. Gladstone Silva, pelas valiosas considerações e ensinamentos prestados durante essa jornada, mostrando-se extremamente prestativo sempre que solicitado. Obrigado por tudo.

Ao Dr. Leif Ryvar den (Universidade de Oslo, Noruega), por importantes sugestões e comentários que permitiram a elaboração de um manuscrito no qual participa como co-autor.

Aos professores Dr. Aristóteles Góes-Neto, Dra. Adrina Gugliotta, Dr. Felipe Wartchow e Dr. Gladstone Silva, componentes da banca avaliadora, pelos importantes questionamentos e comentários emitidos.

Aos companheiros de mestrado com os quais compartilhei momentos de descontrações e angústias. Em especial, Adriana Souza, Alide Lima, Carla Lira, Carolina Silva, Dianny Silva, Fabíola Silva, Ildnay Brandão, Maria Aparecida da Silva, Mona Lisa Venâncio, Michele Chianca e Nylber Silva. Vocês são demais!

Aos amigos e companheiros de pesquisa MSc. Araeska Carena, MSc. Catarina Aragão, Dr. Felipe Wartchow, Dra. Mariele Porto, MSc. Phelipe Oller e MSc. Susane Chang por tornarem meus dias de experimentos mais agradáveis.

Aos amigos do departamento de Micologia da UFPE, Anuska Almeida, Danielle Silva, Diogo Xavier, Georgea Santos, Indra Escobar, Isabela Gonçalves, Lídia Silva, Rafael Vilela, Thaís Lima e Víctor Coimbra.

Ao Sérgio do Laboratório de Microscopia do Departamento de Física da UFPE, por todo apoio durante as análises em microscopia eletrônica de varredura.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, com os quais, além ensinamentos acadêmicos, eu aprendi lições para uma vida.

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de mestrado (IBPG-0677-2.02/09) e suporte financeiro (APQ 0433-2.03/08), além do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (Proc. 470303/2009-3).

Meus sinceros agradecimentos a todos meus grandes amigos da minha terra natal, Vitória de Santo Antão/PE. Em especial, Allan Víctor, Anderson Santos, Débora Ferreira, Luann Ribeiro, Maelle Martins e Thiago Azevedo. Obrigado pela compreensão durante os constantes momentos em que estive ausente.

Aos que passaram os dias todos comigo e aos que estiveram o tempo todo em mim. Este trabalho é a soma de todos vocês e se não é melhor, é por falta de memória, mas não por falta de amigos. Muito obrigado!

Ao meu pai Nelson Lima (in memoriam), que certamente estaria brindando comigo mais essa conquista,

Dedico

RESUMO GERAL

Ganoderma abrange 80 espécies de grande importância econômica e ecológica, caracterizando-se por possuir basidiosporos de parede dupla e ornamentada de ápice truncado. Sua taxonomia é baseada em caracteres morfológicos, porém a pluralidade de termos e critérios por taxonomistas fazem a identificação desse grupo ser caótica. Nessa perspectiva, as regiões ITS e LSU (rDNA) são as mais utilizadas para diferenciação de táxons morfológicamente semelhantes. No presente estudo, foram utilizados tanto exemplares de *Ganoderma* frescos quanto amostras herborizadas para extração de DNA genômico, amplificação das regiões ITS e LSU, e posterior sequenciamento. Desse modo, foram sequenciados 27 espécimes de Ganodermataceae para as regiões ITS e LSU, sendo duas pertencentes à *Tomophagus colossus* e 25 exemplares pertencentes ao gênero *Ganoderma* (14 do subg. *Ganoderma* e 11 do subg. *Elfvíngia*), representando seis espécies para este último gênero. Todas as reconstruções filogenéticas realizadas demonstraram que *Ganoderma* trata-se de um grupo monofilético, distinto de *Tomophagus*, porém pertencentes à mesma família. Para o subgênero *Ganoderma* baseada em exemplares brasileiros, observou-se a delimitação filogenética das cinco espécies estudadas (*G. chalconum*, *G. multiplicatum*, *G. orbiforme*, *G. parvulum* e *G. resinaceum*), todas distintas em relação a *G. lucidum*. No subgênero *Elfvíngia*, os representantes brasileiros momentaneamente identificados como *G. tornatum*, alocaram-se em subclados distintos de acordo com a distribuição geográfica (Mata Atlântica e Floresta Amazônica). De modo geral, para *Ganoderma* observa-se uma forte correlação entre os agrupamentos formados e a distribuição geográfica. Esses resultados demonstram a utilidade das regiões do rDNA, associadas aos métodos tradicionais, nos estudos taxonômicos e sua importância para uma identificação mais confiável das espécies.

Palavras chave: Ganodermataceae; Filogenia; PCR; rDNA.

ABSTRACT

Ganoderma encompasses 80 species of great economic and ecological importance, characterized by ornamented double-walled basidiospores with apex truncated. Its taxonomy is based on morphological characters, but the plurality of terms and criteria for identification of this group are to be chaotic. From this perspective, the LSU and ITS regions (rDNA) are the most commonly used to differentiate morphologically similar taxa. In the present study, we used fresh specimens e dehydrated herbarium specimens of *Ganoderma* for genomic DNA extraction, amplification of the ITS and LSU regions, and subsequent sequencing. Thus, 27 specimens of Ganodermataceae were sequenced for the regions ITS e LSU, two belonging to *Tomophagus colossus* and 25 specimens belonging to the genus *Ganoderma* (14 of subg. *Ganoderma* e 11 of subg. *Elfvigia*), representing six species of the genus. The phylogenetics reconstructions have shown that *Ganoderma* it is a monophyletic group, distinct from *Tomophagus*, but belonging to the same family. For the subgenus *Ganoderma* based on Brazilian specimens, there was phylogenetic delimitation of five species studied (*G. chaliceum*, *G. multiplicatum*, *G. orbiforme*, *G. parvulum* e *G. resinaceum*), all distinct of *G. lucidum*. In subg. *Elfvigia*, the Brazilian representatives momentarily identified as *G. tornatum*, allocated into distinct subgroups according to geographical distribution (Atlantic Forest and Amazon Forest). In this study, there is a strong correlation between the clusters formed and the geographic distribution of specimens analyzed. These results demonstrate the usefulness of rDNA regions, associated with traditional methods, the taxonomic study and its importance for reliable identification of species.

Keywords: Ganodermataceae; Phylogeny; PCR; rDNA.

Lista de abreviaturas

BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
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
ISSR	<i>Inter-Simple Sequence Repeat</i>
LSU	<i>Large Subunit</i> do rDNA
MP	Reconstrução filogenética pelo método de máxima parcimônia
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NJ	Reconstrução filogenética pelo método de neighbor joining
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>

Lista de Figuras

	Página
Figura 01 - Estrutura do rDNA, composto pelo genes 18S/SSU, 5,8S e o gene 28S/LSU espaçados pelas regiões ITS I e II (Begerow <i>et al.</i> , 2009)..	27
Figura 02 - Número anual de sequências de nucleotídeos de fungos depositadas no GenBank desde o estabelecimento do GenBank em 1993. Cinza claro refere-se ao número total de sequências fúngicas existentes; cinza escuro refere-se a apenas ao número de sequências das regiões ITS (rDNA) (Begerow <i>et al.</i> , 2009)	28
Figura 03 - 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 <i>et al.</i> , 2011).....	29
Figura 04 - Reconstrução filogenética do gênero <i>Ganoderma</i> a partir do alinhamento de 1.748 nucleotídeos relativos à combinação dos fragmentos ITS I + ITS II+ LSU (rDNA). Valores de <i>bootstrap</i> (em %) foram gerados a partir do método de máxima parcimônia e de método neighbor joining com as distâncias de Kimura 2-parâmetros (1000 <i>bootstraps</i>), respectivamente, e somente valores acima de 50% são apresentados. Dois exemplares de <i>Tomophagus colossus</i> foram utilizados como grupo externo. Índice de Consistência = 0.7913 e Índice de Retenção = 0.843). *Coleção de Culturas URM; #Coleção de Culturas HUEFS.....	40
Figura 05 - Reconstruções filogenéticas de <i>Ganoderma</i> obtidas a partir do alinhamento de 416 nucleotídeos relativos às regiões ITS I e II (R.1) e de 1326 nucleotídeos da região LSU (R.2), respectivamente. Valores de <i>bootstrap</i> (em %) foram gerados a partir do método de máxima parcimônia e de método neighbor joining com as distâncias de Kimura 2-parâmetros (1000 <i>bootstraps</i>), respectivamente, e somente valores acima de 50% são apresentados. Dois exemplares de <i>Tomophagus colossus</i> foram utilizados como grupo externo. R.1: Índice de Consistência (IC) = 0.8125 e Índice de Retenção (IR) = 0.9461; R.2: IC = 0.8824 e IR = 0.9439.....	45
Figura 06 - Reconstrução filogenética do subg. <i>Ganoderma</i> obtida a partir do alinhamento em 420 sítios relativos às regiões ITS (ITSI + ITSII). Valores de <i>bootstrap</i> (em %) foram gerados a partir do método de método neighbor joining com as distâncias de Kimura 2-parâmetros e pelo método de máxima parcimônia (1000 <i>bootstraps</i>), respectivamente, e somente valores acima de 50% são apresentados. Um exemplar de <i>Amauroderma rude</i> e dois de <i>Tomophagus colossus</i> (URM 80450 e URM 83330) foram utilizados como grupo externo. Índice de Consistência = 0.669 e Índice de Retenção = 0.8916	48

- Figura 07 - *Tomophagus colossus* (URM 83330). **A.** Basidioma. **B-C.** Basidiosporos. Escala: A = 1 cm; B= 10 µm; C = 5 µm..... 49
- Figura 08 - *Ganoderma multiplicatum* (URM 83346). **A-B.** Basidioma. **C.** Superfície himenial. **D-E.** Basidiosporos. Escala: A-B = 1cm; C= 1mm; D = 10 µm; E = 1 µm. **A-B.** Basidioma. **C.** Superfície do poro. **D-E.** Basidiosporos. Escala: A-B = 1 cm; C = 1 mm; E = 1 µm..... 50
- Figura 09 - *Ganoderma parvulum* (URM 83342). **A.** Basidioma. **B.** Superfície himenial. **C.** Presença de depósitos resináceos no contexto. **D.** Basidiosporo. Escala: A = 1cm; B = 1 mm ; D = 1 µm..... 51
- Figura 10 - *Ganoderma chalceum* (URM 80457). **A.** Basidioma. **B.** Superfície himenial. **C.** Presença de linha resinácea no contexto. **D.** Basidiosporos. Escala: A =1cm; B = 1mm; D = 10 µm..... 52
- Figura 11 - *Ganoderma orbiforme* (URM 83335). **A-B** Basidioma. **C.** Contexto. **D.** Superfície himenial. **E-F.** Basidiosporos. **G.** Ornamentação dos basidiosporos em MEV. Escala: A-B = 1cm; C= 1cm; D=1mm; E = 10 µm; F = 2 µm; G = 2 µm..... 54
- Figura 12 - Reconstrução filogenética do subg. *Elfvingia* obtida a partir do alinhamento em 398 sítios relativos às regiões ITS (ITS I + ITS II). Valores de *bootstrap* (em %) foram gerados a partir do método de máxima parcimônia e de método neighbor joining com as distâncias de Kimura 2-parâmetros (1000 *bootstraps*), respectivamente, e somente valores acima de 50% são apresentados. Um exemplar de *Ganoderma parvulum* (URM 83343) e um de *Tomophagus colossus* (URM 83330) foram utilizados como grupo externo. Índice de Consistência = 0.8509 e Índice de Retenção = 0.9676. # = *G. applanatum*; * = *G. applanatum* cplx; ● = *G. australe*; ° = *G. australe* cplx; ◼ = *G. lobatum*; ▲ = *G. tornatum*..... 55
- Figura 13 - *Ganoderma tornatum* (URM 83326). **A-B.** Basidioma. **C.** Superfície himenial. **D.** Presença de linha no contexto. **E-F.** Basidiosporos. **G.** Ornamentação dos basidiosporos. Escala: A-B-C = 1cm; E= 10 µm; F= 2 µm; G = 1 µm..... 58

Lista de Tabela

	Página
Tabela 1 - Lista dos espécimes coletados em diferentes áreas do Brasil.....	32
Tabela 2 - Lista de espécimes de <i>Ganoderma</i> cujas sequências das regiões ITS estão depositadas no GenBank e que foram utilizadas nas reconstruções filogenéticas.....	37
Tabela 3 - Coloração do produto de extração do DNA genômico e diluição necessária para amplificação das regiões ITS e LSU dos espécimes cujos <i>amplicons</i> foram enviados para sequenciamento.....	40

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 Caracterização, importância e taxonomia do gênero <i>Ganoderma</i>	15
2.2 Taxonomia do subgênero <i>Ganoderma</i> (complexo <i>G. lucidum</i>).....	19
2.3 Taxonomia do subgênero <i>Elfvíngia</i> (complexo <i>G. applanatum-australe</i>).....	22
2.4 Avanços e perspectivas da taxonomia molecular de Ganodermataceae.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Material Biológico	32
3.2 Herborização e identificação dos espécimes.....	34
3.3 Extração de DNA, amplificação das sequências-alvo e Sequenciamento.....	35
3.4 Alinhamento das sequências e análise filogenética.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Extração do DNA Genômico e Amplificações das Regiões-Alvo.....	40
4.2 Taxonomia Molecular de <i>Ganoderma</i> : Regiões ITS ou LSU?.....	42
4.3 Análise Filogenética do subg. <i>Ganoderma</i>	47
4.4 Análise Filogenética do subg. <i>Elfvíngia</i>	54
5. CONCLUSÕES	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um dos maiores grupos de organismos em número de espécies, diversidade e significância ecológica (Carlile *et al.*, 2001) e, por serem decompositores naturais, participam praticamente de quase todas as transformações físicas ou químicas na natureza (Moore & Frazer, 2002; Mueller & Bills, 2004).

O filo Basidiomycota caracteriza-se pela produção de basidiosporos (esporos sexuados) em estruturas especializadas denominadas basídios (Alexopoulos *et al.*, 1996; 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).

Ganoderma P. Karst. (Ganodermataceae, Agaricomycetes) é um dos maiores gêneros de fungos poliporóides, abrangendo 80 espécies de ampla distribuição geográfica, com muitas espécies tropicais e outras restritas a regiões temperadas (Kirk *et al.*, 2008). Destas espécies, Ryvardeen (2004) relata a existência de 20 para os neotrópicos, embora Gugliotta *et al.* (2010) mencionem a presença de 22 espécies somente para o território brasileiro.

Este gênero, estabelecido por Karsten (1881), caracteriza-se por apresentar basidiosporos pigmentados, de parede dupla com ápice truncado e de endosporo ornamentado (Moncalvo & Ryvardeen, 1997; Ryvardeen, 2004) e seu nome deriva do grego *ganos* = brilho e *derma* = pele, devido ao fato de vários representantes desse gênero apresentarem basidioma lacado (brilhante) de aspecto envernizado (Kirk *et al.*, 2008).

Além de serem bem conhecidos como decompositores em florestas tropicais e patógenos de plantações como de café e cacau (Zakaria *et al.*, 2009), representantes deste gênero produzem compostos bioativos que são amplamente estudados pela medicina e farmacologia no combate ao câncer, diabetes, hipertensão, tumores e viroses (Zhou *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009a). Já se sabe, por exemplo, que metabólitos secundários produzidos por *Ganoderma colossus* inibem o desenvolvimento do vírus HIV (El Dine *et al.*, 2009).

Embora de grande importância ecológica e biotecnológica, a taxonomia desse gênero tem sido bastante questionada nos últimos anos e pobremente estudada em regiões tropicais (Wang *et al.*, 2009b). Atualmente, *Ganoderma* apresenta complexos de espécies de difícil separação, como o complexo *G. applanatum-australe* e o complexo *G. lucidum* (Kaliyaperumal & Kalaichelvan, 2008; Postnova & Skolotneva, 2010), que deram origem

aos subgêneros *Elfvigia* (basidioma não lacados) e *Ganoderma* (basidioma lacado), respectivamente (Corner, 1983).

Porém, a pluralidade de termos e critérios usados por diferentes taxonomistas evidenciam a inexistência de um consenso para o grupo, o que o fez ser considerado como um verdadeiro “caos taxonômico” (Ryvarden, 1991; Gottlieb *et al.*, 2000). É provável que este seja o gênero mais complexo do ponto de vista morfológico em poliporóides (Ryvarden, 2000).

Embora inquestionável a importância histórica de caracteres morfológicos como a forma dos basidiomas, coloração do contexto, além da morfologia dos basidiosporos na elucidação de espécies do gênero (Seo & Kirk, 2000), uma análise exclusiva desse tipo de caracter apresenta limitações, principalmente para táxons próximos evolutivamente (Alexopoulos *et al.*, 1996). Além disso, a carência de taxonomistas especializados nos mais diversos grupos fúngicos, como *Ganoderma*, também aponta para a necessidade de uma abordagem alternativa a partir de sequências de DNA (Tautz *et al.*, 2003; Góes-Neto, 2007).

Em estudos filogenéticos, o grupo de genes mais utilizado em Basidiomycota é o que codifica o rRNA e, entre eles, destacam-se as regiões ITS e LSU que, em eucariotos, estão presentes em múltiplas cópias e evoluem rapidamente (Fungaro 2000; Rouland-Lefevre *et al.*, 2002). Desse modo, são úteis para discriminar espécies consideradas táxons complexos do ponto de vista morfológico (Fungaro, 2000).

Porém, o número de sequências de nucleotídeos existentes nos bancos de dados moleculares, como o GenBank (NCBI), ainda é insuficiente para a confirmação de todas as espécies conhecidas, principalmente de táxons de áreas tropicais (Begerow *et al.*, 2010). Por exemplo, poucos são os trabalhos moleculares que abordam *Ganoderma* dessas áreas (Wang *et al.*, 2009b), e nestes, apenas dois espécimens brasileiros tiveram sequências de nucleotídeos das regiões ITS incluídas nesses estudos (Gottlieb *et al.*, 2000; Moncalvo & Buchanan, 2008).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar as relações filogenéticas de espécies de *Ganoderma* originários do Brasil a partir da região ITS e LSU (rDNA), com intuito de auxiliar na determinação de táxons complexos do ponto de vista morfológico.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Caracterização, importância e taxonomia do gênero *Ganoderma*

Ganoderma P. Karst. (Ganodermataceae, Basidiomycota) trata-se de um dos maiores gêneros de fungos poliporóides e provavelmente o mais complexo do ponto de vista morfológico (Ryvarden, 2000), abrangendo 80 espécies de ampla distribuição geográfica, sendo algumas, porém, conhecidas apenas para a localidade de seu espécime-tipo (Moncalvo & Ryvarden, 1997).

Ryvarden (2004) mencionou que este gênero possui 20 espécies conhecidas para os neotrópicos, embora Gugliotta *et al.* (2009) contabilizem 22 somente para o território brasileiro. A exceção dos trabalhos de Torrend (1920) e Loguercio-Leite *et al.* (2005), para o Brasil não há estudos específicos sobre o gênero, existindo apenas listas nas quais nem sempre os táxons são ilustrados e descritos.

Este gênero apresenta tanto espécies de regiões tropicais quanto restritas a zonas temperadas, possuindo grande importância ecológica e econômica (Hong & Jung, 2004; Ryvarden, 2004). Além de decompositores da matéria orgânica em diversos ecossistemas tropicais e temperados, podendo ainda ser parasitas de árvores em florestas, algumas espécies são conhecidas em países asiáticos por causar severos danos na produção comercial de monoculturas como café, cacau e borracha (Zakaria *et al.*, 2009).

Algumas espécies têm sido alvo constante de estudos farmacológicos devido a suas propriedades medicinais (Zhou *et al.*, 2007). Inclusive, estas propriedades encontram-se relatadas em manuscritos de antigas civilizações chinesas de 2000 anos atrás (Hong & Jung, 2004; Seo & Kirk, 2000). Espécimes de *G. lucidum* são até hoje conhecidos na China como “Lingzhi” ou “Cogumelo da Imortalidade” e no Japão como “Mannentake” ou “Reishi”, sendo consideradas “ervas da longevidade e da boa fortuna” (Stamets & Yao, 1999; Zhou *et al.*, 2007). No Brasil, é conhecido como “Cogumelo Rei”, “Cogumelo brilhante” ou “Cogumelo do Imperador” (Mau *et al.*, 2001).

Estudos recentes apontam que polissacarídeos, proteínas e terpenóides isolados de espécies de *Ganoderma* possuem ações comprovadas no combate e prevenção de doenças cardíacas, hipertensão, diabetes, viroses como a hepatite, diversos tumores e câncer (Zhou *et al.*, 2007; Smania *et al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2008; Yoshimura *et al.*, 2010). Já se sabe também que metabólitos secundários produzidos por *G. colossus* inibem o desenvolvimento do vírus HIV (El Dine *et al.*, 2009).

O gênero *Ganoderma* (do grego: *ganos* = brilho e *derma* = pele) foi estabelecido por Peter Adolf Karsten em 1881, baseado numa única espécie de origem européia, *Polyporus lucidus* (Curtis) Fr., de píleo estipitado, lacado e com basidiosporos de parede dupla, e que havia sido primeiramente descrito pelo botânico inglês William Curtis ainda no século XVI como *Boletus lucidus* W. Curt (Karsten, 1881).

Nos anos seguintes, inúmeros pesquisadores passaram a utilizar diferentes critérios e caracteres morfológicos na identificação de *Ganoderma*, muitos com base em táxons geograficamente restritos (Murrill, 1902, 1903, 1905a; Atkinson, 1908; Ames, 1913; Haddow, 1931; Overholts, 1953; Furtado, 1967; Steyaert, 1972, 1980; Bazzalo & Wright, 1982; Corner, 1983).

A princípio, a identificação das espécies baseava-se principalmente em sua especificidade ao hospedeiro, na coloração do contexto, forma da margem do píleo e na presença ou ausência de estipe, além de sua distribuição geográfica (Pattouillard, 1889; Boudier & Fischer, 1984; Boudier, 1895; Murrill, 1902, 1908). Além dos caracteres já citados, Haddow (1931) e Steyaert (1980) passaram a levar em consideração também a anatomia dos basidiosporos e a anatomia das células da cutícula.

Numa das mais importantes monografias sobre gênero, Patouillard (1889) incluiu neste grupo todos os fungos poliporóides que possuíam basidiosporos de parede dupla, porém dividindo-o em duas seções: seção *Ganoderma* para agrupar os representantes que possuíam basidiosporos com parede dupla de ápice truncado, e a seção *Amauroderma* cujos representantes caracterizavam-se por possuir basidiosporos esféricos a subesféricos com parede dupla e uniformemente espessa (Pegler & Young, 1973). Nesse momento, *Ganoderma* já estava sendo representado por 48 espécies (Patouillard, 1889).

Coincidentemente, no mesmo ano, Karsten (1889) estabeleceu o gênero *Elfvigia* Karst. para acomodar as espécies do grupo que não possuíam basidioma lacado. A partir de então foram observadas várias outras segregações ao nível genérico e infragenérico em *Ganoderma* (Moncalvo & Ryvarden, 1997).

Murrill (1905a) elevou a então seção *Amauroderma* à categoria de gênero, distinguindo-o em relação à *Ganoderma* com base na morfologia dos basidiosporos apontados por Patouillard (1889). Esta distinção foi amplamente aceita por micologistas europeus e norte-americanos que eram responsáveis pelos principais trabalhos taxonômicos do grupo (Pegler & Young, 1973).

Em seguida, Murrill (1995b) estabeleceu ainda o gênero *Tomophagus* (Fr.) Murrill para acomodar espécimes de *G. colossus* (Fr.) C.F. Baker que possuíam um contexto esponjoso bem diferente das demais espécies até então conhecidas.

Estudos posteriores, no entanto, não aceitaram este carácter taxonômico relevante ao ponto de ser responsável pela criação de um novo gênero, e então *Tomophagus* passou a ser considerado sinônimo de *Ganoderma* (Furtado, 1965b; Steyaert, 1972; Corner, 1983; Ryvar den, 1991). Steyaert (1980) chegou a sugerir que *G. colossus* seria, na verdade, uma variação tropical da espécie norte-americana *G. oregonense* Murrill que também possuía contexto esponjoso.

Furtado (1965a) ao realizar uma grande revisão taxonômica em *Ganoderma*, apontou que a ausência de laca na superfície píleo não poderia ser utilizada isoladamente como um carácter determinante para a criação do gênero *Elfvíngia* e, desse modo, recolocou-o em *Ganoderma*, porém como um subgênero. O mesmo confirmou as observações primeiramente realizadas por Imazeki (1939), ao perceber a presença de píleo levemente lacado em alguns representantes de *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.

Ganoderma passava então a ser representada pelos subgêneros *Ganoderma* e *Elfvíngia*, distintos do gênero *Amauroderma*, porém todos pertencentes à *Ganodermataceae* (Furtado, 1965b), família esta estabelecida por Donk (1964) para agrupar todas as espécies que possuíam basidiosporos com parede dupla e ornamentada.

Furtado (1965a) mencionou ainda que o sistema hifálico e o formato do basídio não poderiam ser adotados como caracteres decisivos na segregação de novos gêneros em *Ganoderma*, afirmando ainda que o tamanho e a forma dos basidiosporos eram os caracteres mais relevantes para diferenciações de espécies neste gênero.

Desse modo, Steyaert (1972) criou três novos gêneros (*Humphreya* Steyaert, *Haddowia* Steyaert e *Magoderma* Steyaert) baseados na morfologia dos basidiosporos e nas características anatômicas da superfície himenial, que apresentavam distinções em relação aos padrões genéricos até então aceitos. No entanto, Pegler & Young (1973) reconheceram apenas os gêneros *Amauroderma*, *Elfvíngia* e *Ganoderma* como pertencentes a *Ganodermataceae*, estando os representantes de *Humphreya*, *Haddowia* e *Magoderma* inclusos em *Ganoderma*.

Baseado na análise de microestruturas da superfície superior do píleo (células da cutícula), carácter idealizado por Haddow (1931), Steyaert (1980) propôs ainda dividir *Ganoderma* em quatro seções, criando assim os subgêneros *Anamixoderma* e *Plecoderma*,

além dos já conhecidos subgêneros *Ganoderma* e *Elfvíngia*. Estas segregações, porém, não foram aceitas por Corner (1983), que considerou cinco gêneros para a família (*Amauroderma*, *Ganoderma*, *Haddowia*, *Humphreya* e *Trachyderma*). De todo modo, o formato e disposição das células da cutícula passavam a ser utilizados como valiosos caracteres taxonômicos na diferenciação de espécies no gênero.

Zhao *et al.* (1989) ainda abordou, sem sucesso, a diferenciação de espécies em *Ganoderma* com base na coloração do contexto. Contudo, suas distinções não foram aceitas, pois fatores ambientais influenciavam a coloração dos mesmos (Ryvarden, 1991).

Moncalvo & Ryvarden (1997) ao estudar 386 nomes pertencentes à Ganodermataceae consideraram *Amauroderma*, *Ganoderma*, *Elfvíngia*, *Tomophagus*, *Humphreya* e *Haddowia* informalmente como grupos e, após exclusão de vários nomes considerados ilegítimos ou sinônimos, apontou 118 espécies como pertencentes ao “Grupo *Ganoderma*” e 30 ao “Grupo *Elfvíngia*”. Atualmente, contudo, quatro gêneros são reconhecidos para a família (*Amauroderma*, *Ganoderma*, *Haddowia* e *Humphreya*) (Kirk *et al.*, 2008).

Em *Ganoderma*, a pluralidade de termos e critérios utilizados por diferentes taxonomistas, evidenciava a inexistência de um consenso para a taxonomia do grupo (Gottlieb *et al.*, 2000), o que o fez ser considerado um verdadeiro “caos taxonômico” (Ryvarden, 1991) e o mais morfológicamente complexo em Polyporales (Ryvarden, 2000).

Embora inquestionável a importância histórica dos caracteres morfológicos na elucidação do conceito de gêneros e na separação de complexos de espécies, o uso exclusivo desses dados apresenta limitações, principalmente para táxons evolutivamente próximos (Alexopoulos *et al.*, 1996; Tautz *et al.*, 2003). Por isso, o uso de dados moleculares na sistemática de *Ganoderma* passou a ser aplicado por muitos taxonomistas (Moncalvo *et al.*, 1995a; Moncalvo *et al.*, 1995b; Hseu *et al.*, 1996; Gottlieb *et al.*, 1998, 2000; Smith & Sivasithamparam, 2000; Hong & Jung, 2004; Zheng *et al.*, 2007; Kaliyaperumal & Kalaichelvan, 2008; Moncalvo & Buchanan, 2008; Zakaria *et al.*, 2009).

Atualmente, *Ganoderma* apresenta complexos de difícil separação, como o complexo *G. lucidum* (= subgênero *Ganoderma*) e o complexo *G. applanatum-australe* (= subgênero *Elfvíngia*) (Kaliyaperumal & Kalaichelvan, 2008; Postnova & Skolotneva, 2010).

2.2 Taxonomia do subgênero *Ganoderma* (complexo *G. lucidum*)

A espécie tipo de *Ganoderma*, *G. lucidum* stricto sensu é a espécie mais frequentemente citada em pesquisas farmacológicas para fins medicinais (Zhou *et al.*, 2007). No entanto, estudos taxonômicos recentes indicam que vários espécimes utilizados nessas abordagens, possivelmente, não se tratavam de *G. lucidum*, e sim de espécies próximas pertencentes ao mesmo subgênero (Buchanan, 2001; Wang *et al.*, 2009b).

Ryvarden (1995), ao analisar morfologicamente 53 espécimes da Noruega, observou que o tamanho do basidioma e basidiosporos, além do sistema hifálico, deveriam ser analisados com cuidado, pois alguns representantes de *G. lucidum* poderiam apresentar variações morfológicas individuais. Observou ainda que a quantidade de poros por milímetro e a disposição das células da cutícula eram os caracteres mais contundentes para caracterizar a espécie.

A incapacidade de perceber essas variações no passado levou a descrição frequente de espécimes de *G. lucidum* como sendo novas espécies para a ciência. Somente para a Europa, exemplares de *G. lucidum* foram descritos 13 vezes como espécie nova por diferentes autores (Ryvarden, 2000).

Numa tentativa de desestimular essas “novas descobertas” para o grupo, Ryvarden (1995) propôs que nenhuma nova espécie pertencente a esse complexo fosse publicada até 2005, e quem descumprisse essa regra estaria sentenciado a revisar pelo menos outros 10 nomes mais antigos.

Para os neotrópicos, devido à carência de estudos taxonômicos com base em exemplares dessas áreas, várias espécies são também confundidas e depositadas em coleções de herbário como sendo *G. lucidum* (Ryvarden, 2000).

Em um abrangente estudo do complexo *G. lucidum* da América do Norte, Adaskaveg & Gilbertson (1986) observaram que linhagens norte-americanas de *G. lucidum* eram compatíveis com cepas européias identificadas como *G. resinaceum*, embora estudos filogenéticos posteriores apontassem que estas espécies não deveriam ser consideradas uma única espécie, chamando ainda mais a atenção para a necessidade de estudos mais amplos no gênero (Moncalvo *et al.* 1995a).

O uso de dados moleculares, especialmente sequências de DNA nas duas últimas décadas, vem sendo responsável por significativos progressos na taxonomia do subg.

Ganoderma e do gênero como um todo, sendo capazes de discriminar vários táxons morfológicamente indistinguíveis (Postnova & Skolotneva, 2010).

A princípio, Moncalvo *et al.* (1995a) demonstraram que sequências de nucleotídeos da região ITS (rDNA) poderiam ser usados isoladamente ou em combinação com o domínio divergentes D2/LSU (rDNA) na diferenciação de algumas espécies em *Ganoderma*. Ao analisar filogeneticamente exemplares da América do Norte, Europa e Ásia, foi observada a formação de quatro clados pertencentes ao subgênero *Ganoderma*, dois dos quais possuíam representantes identificados como *G. lucidum*, embora relações entre esses agrupamentos não pudessem ser totalmente resolvidos (Moncalvo *et al.* 1995a). Esses agrupamentos não corroboraram os grupos infragenéricos criados por Steyaert (1980) e Zhao (1989), com base na estrutura da cutícula e coloração do contexto, respectivamente.

Nesse estudo, Moncalvo *et al.* (1995a) observaram que espécimes identificados como *G. lucidum* para a Índia, Taiwan e Filipinas eram de fato representantes da mesma espécie, porém distintos em relação ao representante de *G. resinaceum* de origem européia, espécie esta que já fora considerada *G. lucidum* para a América do Norte por Adaskaveg & Gilbertson (1986) a partir de estudos de compatibilidade.

Em um estudo filogenético subsequente, Moncalvo *et al.* (1995b) observaram a formação seis agrupamentos somente para o subgênero *Ganoderma*. Destes, cinco clados continham pelo menos um espécime identificado como *G. lucidum*, porém em apenas um clado alocaram-se os espécimes de origem européia, local onde a espécie foi descrita pela primeira vez.

Moncalvo *et al.* (1995b) observaram que representantes *G. lucidum* originários da América do Norte e Ásia não se agruparam com espécimes de *G. lucidum* da Europa. Estes resultados representaram uma forte evidência que *G. lucidum* poderia ser geograficamente restrita ao continente europeu (Ryvarden, 2000).

Recentemente, Wang *et al.* (2009b), baseando-se na combinação de dados morfológicos e moleculares, observaram que exemplares asiáticos identificados como *G. lucidum* que foram utilizados nos estudos filogenéticos de Moncalvo *et al.* (1995a, b), na verdade, se tratavam de representantes de *G. multipileum*, uma espécie tipicamente asiática. Este resultado corroborou com as hipóteses de que *G. lucidum* não ocorre para Ásia, sendo restrita a Europa.

Embora houvesse indicação de que cada clado obtido nas reconstruções filogenéticas de Moncalvo *et al.* (1995b) estivesse agrupando representantes de mais de uma espécie, Hseu *et al.* (1996) não conseguiram distinguir vários táxons internamente nos cladogramas a partir de RAPD, o que fez essa técnica ser apontada como de resultados menos contundente para diferenciações em *Ganoderma*. Porém, Zakaria *et al.* (2009), ao estudar espécimes da Malásia, conseguiram com êxito diferenciar espécimes de *G. australe*, *G. boninense*, *G. philippii* e *G. lucidum* através dos padrões de RAPD e de RFLP.

Simultaneamente, Moncalvo *et al.* (1995c) observaram ainda que *G. colossus* não se tratava de um representante de *Ganoderma* e sim de um gênero distinto: *Tomophagus colossus*, conforme primeiramente idealizado por Murrill (1905b). Esta distinção foi confirmada pelos estudos filogenéticos de Hong & Jung (2004) e Tham *et al.* (2011), e foi seguida no presente trabalho. Entretanto, o Index Fungorum (www.indexfungorum.org/names) ainda consideram *Tomophagus* como sinônimo de *Ganoderma*, ao contrário do MycoBank (<http://www.mycobank.org>) e do CBS (<http://www.cbs.knaw.nl>).

Tomophagus caracteriza-se morfológicamente por apresentar superfície lacada amarelada, muitos clamidiosporos, hifas do contexto ligeiramente dextrinóide e basidiosporos bem maiores que os demais representantes de *Ganoderma* (Ryvarden, 2004), sendo representado atualmente por apenas duas espécies: *T. cattienensis* Tham & Moncalvo e *T. colossus* (Fr.) Murrill (Tham *et al.*, 2011).

Os primeiros estudos moleculares para o subg. *Ganoderma* realizados na América do Sul utilizaram marcadores isoenzimáticos e incluíram basicamente táxons argentinos (Gottlieb *et al.*, 1998). A partir dessa análise, foi observado um baixo nível de congruência dos dendrogramas obtidos a partir dos dados isoenzimáticos em relação a caracteres morfológicos como anatomia dos basidiosporos e elementos da cutícula, o que fez essa técnica ser considerada de resultados limitantes para abordagens relacionadas à diferenciação de espécies.

A primeira abordagem filogenética com base em espécies da América do Sul só foi realizada no início da década passada por Gottlieb *et al.* (2000). Porém, nesse estudo pioneiro, foi analisada uma baixa quantidade de táxons. Para o subg. *Ganoderma*, por exemplo, apenas sete espécies foram analisadas, e destas a maioria dos espécimes eram argentinos e com apenas um espécime de origem brasileira, evidenciando a necessidade de um estudo filogenético mais amplo com base em espécimes de outras áreas sul-americanas.

Embora se tenha observado o monofiletismo do subg. *Ganoderma* e sua distinção em relação ao subgênero *Elfvíngia*, Gottlieb *et al.* (2000) tiveram dificuldades em caracterizar alguns espécimes ao nível específico. Por exemplo, espécimes argentinos identificados preliminarmente como *G. lucidum* agruparam-se em subclados distantemente relacionados entre si e, ao contrário, espécimes de *G. sessile*, *G. platense* e *G. zonatum*, mesmo sendo identificados como espécies distintas, agruparam-se no mesmo subclado, sem diferenciação aparente.

Atualmente, não restam dúvidas de que esse baixo número de sequências de nucleotídeos existentes nos bancos de dados moleculares, especialmente relativas a espécies tropicais, é um fator limitante para o entendimento das relações filogenéticas do grupo, assim como diferenciações e caracterizações de espécies (Bengerow *et al.*, 2010).

2.3 Taxonomia do subgênero *Elfvíngia* (complexo *G. applanatum-australe*)

Embora biotecnologicamente menos importante em relação aos do subg. *Ganoderma*, exemplares de *Elfvíngia* são também reconhecidos por importantes propriedades farmacológicas (Lindequist *et al.*, 2005).

Este grupo possui ampla distribuição geográfica e foi primeiramente mencionado como subgênero por Imazeki (1943), com base na espécie de basidioma não lacado *Polyporus applanatus* (Pers.) Wallr. Esta segregação foi amplamente aceita por diversos pesquisadores (Steyaert, 1980; Corner, 1983; Zhao, 1989; Gottlieb & Whight, 1999b).

Para os neotrópicos, Ryvardeen (2004) menciona a existência de seis espécies para este subgênero (*G. amazonense*, *G. australe*, *G. citriporum*, *G. coffeatum*, *G. guianensis* e *G. neurosporum*), enquanto existem relatos da existência de pelo menos oito espécies para a América do Sul (Gottlieb & Whight, 1999b).

Neste subgênero, a alta plasticidade de caracteres como tamanho dos basidiosporos, coloração do contexto e consistência e o tamanho do píleo, geralmente atribuída a fatores ambientais, tem sido relatada por autores como um entrave para identificações do grupo (Steyaert, 1975; Steyaert 1980; Chen, 1993; Chang *et al.*, 1996; Gottlieb & Wright 1999b).

Historicamente, assim como ocorre no subg. *Ganoderma*, distinções nesse complexo estão longe de ser universalmente aceitas, e, portanto, são alvos de constantes questionamentos, especialmente em relação a *G. australe* e *G. applanatum* (Martinez *et al.*, 1991). Na Europa, por exemplo, basidiomas de *G. applanatum*, *G. australe* e táxons afins são frequentemente confundidos uns com os outros (Leonard, 1998).

Atualmente, caracteres como tamanho dos basidiosporos e a presença ou ausência de linhas ou incrustações resináceas no contexto são os mais utilizados nas diferenciações desse complexo (Ryvarden, 2004; Kaliyaperumal & Kalaichelvan, 2008).

Ryvarden (2004) mencionou que, embora morfológicamente semelhantes, *G. applanatum* se distingue em relação a *G. australe* por possuir basidiosporos menores e ausência de linhas no contexto. Porém, já se sabe que em exemplares jovens de *G. australe* a observação dessa linha nem sempre é possível (Furtado, 1965a).

Além disso, pesquisadores acreditam que *G. applanatum* seja uma espécie restrita a regiões temperadas, enquanto *G. australe* possuiria uma ampla distribuição geográfica, sendo, porém, comum aos neotrópicos (Corner, 1983; Ryvarden, 2004). Para o Brasil, no entanto, Torres-Torres *et al.* (2011) acreditam na existência de ambas as espécies.

Somente nos últimos anos, estudos de compatibilidade e por ferramentas moleculares estão sendo capazes de esclarecer alguns questionamentos neste complexo. A princípio, através de estudos de compatibilidade, Yeh & Chen (1990) e Chen (1991) diferenciaram dois grupos de *G. australe* em Taiwan, de localidades distintas e com condições de altitude e temperatura diferenciadas. Entretanto, exemplares de um destes grupos apresentaram compatibilidade com exemplares identificados como *G. lipsiense* da Índia e que foram coletados em áreas de condições ambientais semelhantes. Porém, estes não apresentaram compatibilidade com *G. lipsiense* de origem européia e com *G. australe* da Flórida (Yeh *et al.*, 2000; Kaliyaperumal & Kalaichelvan, 2008). Estes resultados apontaram que diferentes condições ambientais poderiam influenciar na diferenciação de espécies do subg. *Elfvingia*.

Posteriormente, estudos a partir de sequenciamento das regiões ITS e LSU (rDNA) utilizando representantes da Ásia, Europa e América do Norte observaram que este subgênero representa um grupo monofilético (Moncalvo *et al.*, 1995a), o que foi confirmado por Gottlieb *et al.* (2000) ao estudar táxons da América do Sul. Este, por sinal, é o único trabalho filogenético com base em exemplares sul-americanos.

Neste estudo, Gottlieb *et al.* (2000) observaram que exemplares de *G. lipsiense*, *G. tornatum* e *G. lobatum* originários da América do Sul, incluindo um representante de *G. tornatum* do Brasil, agruparam-se em subclados à parte em relação aos representantes da Europa e da América do Norte, apontando a distribuição geográfica como taxonomicamente importante no estudo desse complexo.

Resultados semelhantes foram observados nos estudos filogenéticos de Smith & Sivasithamparam (2000). Espécimes de *G. australe* de origem australiana apresentaram-se distintos em relação aos de origem européia, assim como em relação aos representantes identificados como *G. applanatum* coletados no Hemisfério Norte.

A confusão taxonômica entre *G. australe* e *G. applanatum* está intimamente ligada ao fato do espécime-tipo de *G. australe*, “coletado em uma ilha do Oceano Pacífico” (Fries, 1828), ter sido perdido, existindo apenas descrições incompletas (Moncalvo & Ryvardeen 1997, Gottlieb & Wright 1999b).

Se o nome de *G. australe* deve ser mantido, como sugerem alguns pesquisadores, uma neotipificação se faz urgente. No entanto, Gottlieb & Wright (1999b) defendem que *G. australe* deve ser considerado um sinônimo para *G. tornatum* (Pers.) Bres., conforme abordado por Steyaert (1975). Esta espécie possui espécime-tipo de localização conhecida e descrições modernas, sendo por isso, o nome amplamente aceito.

Recentemente, uma maior diferenciação do complexo *G. australe-applanatum* foi abordada por Moncalvo & Buchanan (2008) a partir de um amplo estudo filogeográfico utilizando sequências das regiões ITS de representantes de todos os continentes.

Ao analisarem filogeograficamente o que consideraram “complexo *Ganoderma applanatum-australe*”, Moncalvo & Buchanan (2008) observaram oito subtipos para este complexo. Nesse estudo, esses agrupamentos apresentavam uma forte correlação com a distribuição geográfica. Dois desses subclados incluíram basicamente representantes do Hemisfério Norte; dois abrangeram os táxons do Hemisfério Sul, porém um deles contendo também exemplares asiáticos; outro subclado foi formado exclusivamente por exemplares asiáticos; um com exemplares neotropicais; e os dois subclados restantes foram formados por espécimes da Malásia e da Tailândia, respectivamente.

Por estudos de compatibilidade, Moncalvo & Buchanan (2008) apontaram ainda que, de modo geral, espécimes neozelandeses não apresentaram compatibilidade com exemplares de origem asiática, apresentando, contudo, compatibilidade com alguns representantes da Argentina, que igualmente pertencem ao Hemisfério sul.

Embora esses estudos possam sugerir evidências sobre processos de especiação, apontar os fatores que ocasionam esses processos para fungos continua sendo um grande desafio (Buchanan, 2001). Moncalvo & Buchanan (2008) acreditam que *Ganoderma* tenha surgido há aproximadamente 60 milhões de anos e o subgênero *Elfvigia* há pelo menos 30 milhões. Nessa época, os continentes já apresentavam conformação próxima à atual e,

desse modo, diferenciações relacionadas com a teoria da tectônica de placas não explicariam a distribuição geográfica desse grupo, contrariando as teorias aplicadas até então para outros gêneros em Basidiomycota (Halling *et al.*, 2008; Geml *et al.*, 2008).

De todo modo, ao analisar o estado atual da taxonomia de *Elfvigia*, assim como do gênero *Ganoderma* como um todo, evidencia-se que novos estudos filogenéticos aliados a análises morfológicas acuradas são necessários para elucidação da confusão taxonômica atual do grupo, principalmente com base em espécies de áreas até o momento não estudadas.

2.4 Avanços e perspectivas da taxonomia molecular de Ganodermataceae

Com o advento das tecnologias modernas da biologia molecular, surgiram diversos tipos de marcadores moleculares que detectam o polimorfismo genético diretamente no DNA. O princípio da utilização desses marcadores baseou-se no pressuposto de que diferenças genéticas denotam, na maioria das vezes, diferenças fenotípicas (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Faleiro, 2007).

Marcadores moleculares podem ser descritos como elementos capazes de mapear, caracterizar e prever um fenótipo molecular, permitindo a análise molecular da variabilidade genética (Caixeta *et al.*, 2006). Entre suas vantagens, pode-se citar a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, permitindo a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente, além da possibilidade de detecção desses polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento (Faleiro, 2007).

Devido aos avanços das ferramentas moleculares, a década de 90 foi considerada turbulenta para a sistemática dos fungos, pois muitos trabalhos baseados exclusivamente na taxonomia clássica foram reavaliados (Seifert, 2009). Nos dias atuais, cada vez mais os pesquisadores estão utilizando dados moleculares nos sistemas de identificação (Herbert *et al.*, 2003; Seifert *et al.*, 2007; Bruns *et al.*, 2008).

Atualmente, a maioria dos taxonomistas micológicos também possui uma dimensão da importância dos estudos moleculares e, nessa perspectiva, o sequenciamento de DNA para utilização em sistemas de identificação está sendo cada vez mais utilizado (Singer & Hajibabaei, 2009; Seifert, 2009).

Como consequência, a sistemática de Agaricomycetes passou a sofrer profundas modificações, pois estudos moleculares permitiram inferências filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos desta classe (Moncalvo *et al.*, 2000; Binder & Hibbett, 2002; Góes-

Neto *et al.*, 2002; Wagner & Fischer, 2002; Larsson & Larsson, 2003; Larsson *et al.*, 2006; Hibbett *et al.*, 2007; Blackwell *et al.*, 2006; Garnica *et al.*, 2007).

Nessa perspectiva, a taxonomia de *Ganoderma* também passou a sofrer significativas modificações, especialmente a partir dos estudos baseados em sequências do DNA ribossomal (Moncalvo *et al.*, 1995a; Moncalvo *et al.*, 1995b; Hseu *et al.*, 1996; Gottlieb *et al.*, 2000; Smith & Sivasithamparam, 2000; Hong & Jung, 2004; Kaliyaperumal & Kalaichelvan, 2008; Moncalvo & Buchanan, 2008).

No entanto, toda essa reviravolta nos estudos da taxonomia clássica dos fungos só foi possível devido a uma descoberta que revolucionou as pesquisas relacionadas com a biologia molecular. Em 1987, Mullis e Faloona publicaram o clássico artigo "Síntese específica do DNA *in vitro* através de uma reação em cadeia catalisada pela polimerase", que consistiu no desenvolvimento da técnica de amplificação de fragmentos de DNA *in vitro*, em uma escala exponencial (Fungaro, 2000; Schlötterer, 2004; Schulman, 2007).

Esta técnica chamada de "Reação em Cadeia da Polimerase" (PCR) aumentou consideravelmente a eficiência da detecção de polimorfismos no DNA de diversos organismos por se tratar de uma ferramenta relativamente rápida, simples e segura, capaz de permitir a obtenção de outras classes de marcadores moleculares que têm igualmente revolucionado a genética molecular (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A grandeza desse método é facilmente percebida pelo volume crescente de sequências de DNA depositadas nos bancos de dados (Begerow *et al.*, 2010; Hibbett *et al.*, 2011). Este método pode ser utilizado em diversas áreas da biologia, incluindo sistemática e caracterização de linhagens, variações genéticas inter e intra-específica a partir da amplificação de genes de interesse, além de permitir o desenvolvimento de outros marcadores moleculares como ISSR, RAPD e RFLP (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Fungaro, 2000).

Para fungos, com o advento da PCR, 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). Além disso, permitiu a seleção de oligonucleotídeos (*primers*) específicos que tem fornecido fácil acesso ao seu genoma, permitindo inferências filogenéticas, estudos taxonômicos e de genética de populações, bem como posterior aplicação diagnóstica desses novos conhecimentos (White *et al.*, 1990; Carlile & Watkinson, 1994).

Desde a publicação do clássico trabalho de White *et al.* (1990), no qual os autores descrevem uma lista de oligonucleotídeos para a amplificação e sequenciamento de rDNA nuclear e mitocondrial, inúmeros estudos têm sido publicados relacionados com análise molecular de fungos, sendo uma das primeiras aplicações da PCR na micologia (Fungaro, 2000).

Em estudos filogenéticos, o grupo de genes mais utilizado são os que codificam o rRNA (Fig. 1). Esses genes, em eucariotos, estão presentes em múltiplas cópias, não codificam proteínas e são repetidos *in tandem* (Hibbett, 1992). O DNA que codifica o RNA ribossômico apresenta-se como um agrupamento gênico, composto pelo gene 18S/SSU, o gene 5,8S e o gene 28S/LSU. Estes genes são separados por regiões espaçadoras denominadas ITS I e ITS II, as quais 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 (Rouland-Lefevre *et al.*, 2002; Hibbett, 1992).

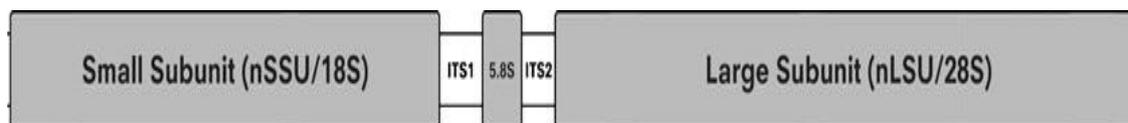


Fig. 1: Estrutura do rDNA, composto pelo genes 18S/SSU, 5,8S e o gene 28S/LSU espaçados pelas regiões ITS I e II (Begerow *et al.*, 2009).

A região 18S ou SSU (*Small Subunit*), por exemplo, é a mais conservada e, por isso, é utilizada em comparação de organismos distantemente relacionados. A porção 28S ou LSU (*Large Subunit*) é mais variável e, portanto, apropriada para a comparação entre gêneros e até mesmo espécies. As regiões ITS possuem alta variação interespecífica, desse modo, são apropriadas para discriminar espécies proximamente relacionadas (Chen *et al.*, 2001; Rouland-Lefevre *et al.*, 2002; Nilsson *et al.*, 2009).

Dessa forma, sequências do DNA ribossomal (rDNA) têm sido amplamente utilizado em diferentes níveis taxonômicos, como em ordens e famílias (Hibbett & Donoghue, 1995; Wagner & Fischer, 2001) e em discussões entre gêneros e sub-gêneros (Vilgalys & Sun 1994; Cooke & Duncan 1997; Anderson *et al.*, 1998; Chillali *et al.*, 1998; Ueng *et al.*, 1998; Gottlieb *et al.*, 2000).

Embora inquestionável a importância dos caracteres morfológicos e bioquímicos na elucidação de relações filogenéticas entre diversos grupos fúngicos (Alexopoulos *et al.*,

1996), a utilização exclusiva de dados morfológicos apresenta limitações, principalmente entre táxons evolutivamente próximos (Góes-Neto, 2007).

Além disso, a carência de taxonomistas especializados nos diferentes grupos de organismos e a dificuldade de se estabelecer táxons considerados complexos do ponto de vista morfológico, como *Ganoderma*, aponta para a necessidade de uma abordagem alternativa a partir de sequências de DNA (Buchanan, 2001; Tautz *et al.*, 2003).

A utilização desses dados como ferramenta auxiliar a taxonomia clássica, também chamada de código de barras de DNA (*DNA barcode*), foi idealizada por Herbert *et al.* (2003) e consiste numa técnica diagnóstica em que sequências de DNA auxiliariam a identificação das espécies de maneira análoga a um código de barras que identifica e distingue produtos comerciais (Hajibabaei *et al.*, 2007).

Nessa perspectiva, um código de barras de DNA ideal deve ser variável ao nível específico e pouco variável ao nível infra-específico, além de ser de fácil amplificação, sequenciamento e alinhamento (Góes-Neto, 2007).

Porém, está claro que o baixo número de sequências de nucleotídeos existentes nos bancos de dados moleculares, especialmente referentes a táxons de áreas tropicais, é um fator limitante para estudos filogenéticos de muitos grupos fúngicos, como em *Ganoderma*, embora tenha ocorrido um considerável crescimento nos últimos anos (Hibbett *et al.*, 2011). Segundo Bengerow *et al.* (2010), até 2009 existiam cerca de um milhão de sequências fúngicas depositadas no GenBank, e destes, cerca de 147 mil eram sequências das regiões ITS (Fig. 2).

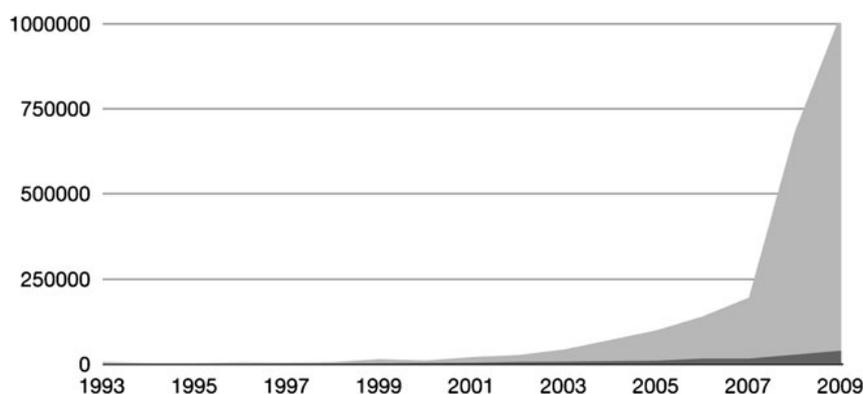


Fig.2. Número anual de sequências de nucleotídeos de fungos depositadas no GenBank desde o estabelecimento do GenBank em 1993. Cinza claro refere-se ao número total de sequências fúngicas existentes; cinza escuro refere-se a apenas ao número de sequências das regiões ITS (rDNA) (Begerow *et al.*, 2009).

A taxonomia tem como principal objetivo refletir uma classificação natural dos táxons, e nessa perspectiva, dados moleculares oferecem um conjunto de importantes caracteres para a base de decisões taxonômicas. Desse modo, sequências de DNA estão sendo também cada vez mais utilizadas nos estudos que envolvem descrições de espécies novas para ciência, principalmente se comparadas ao início da década passada (Seifert, 2009; Tautz *et al.*, 2000). Este fato pode ser facilmente observado pela figura 3.

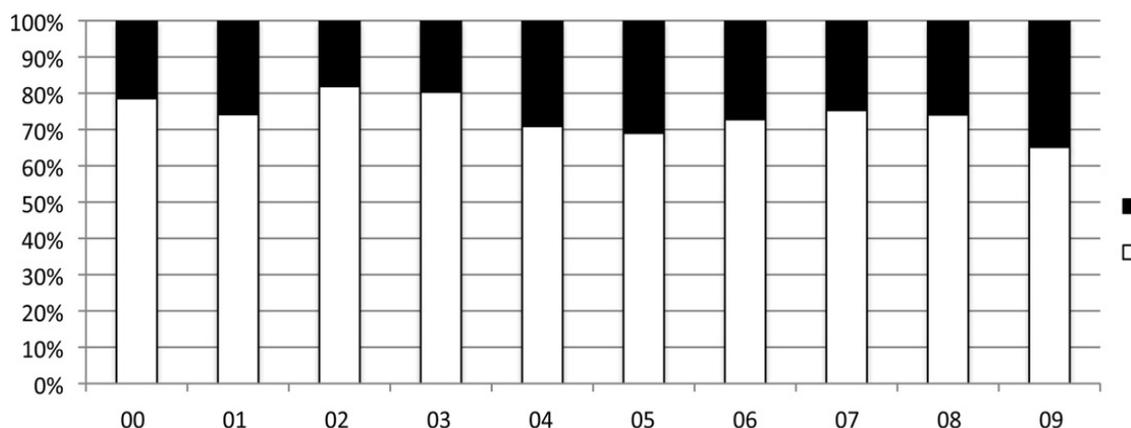


Fig.3. Percentual de novas espécies de fungos registradas no Index Fungorum de 2000 a 2009, incluindo aqueles com (preto) e sem (branco) sequências de DNA depositadas no GenBank (Hibbett *et al.*, 2011).

Para fungos, as regiões ITS são as mais popularmente utilizadas em inferências filogenéticas, sendo consideradas como “DNA *barcode*” (Nilsson *et al.*, 2008; Seifert, 2009; Singer & Hajibabaei, 2009; Hibbett *et al.*, 2011). Além de possuírem uma alta variação interespecífica, estas regiões são flanqueadas por segmentos conservados, possuem um grande número de cópias no genoma, além de serem relativamente curtas, sendo assim facilmente amplificadas por PCR (Rouland-Lefevre *et al.*, 2002).

Se a estimativa mais recente de que devam existir 5,1 milhões de espécies de fungos (Blackwell, 2011) estiver correta, não é somente a baixa porcentagem atual de espécies catalogadas que impressiona (cerca de 2%), pois uma porcentagem ainda menor de espécies possuem algum trecho de seu DNA sequenciado e disponível nos bancos de dados moleculares (Bengerow *et al.*, 2010).

Nos estudos recentes, há um consenso de que comparações de múltiplas filogenias gênicas representam um poderoso método para avaliar os limites das espécies (Taylor *et al.*, 2000). Este processo resultou no mais abrangente estudo de filogenia de fungos em nível de reino realizado por James *et al.* (2006), utilizando dados de seis regiões gênicas (18S rDNA, 28S rDNA, 5.8S rDNA, *tef*, *rpb1* e *rpb2*) de 200 espécies dos principais

clados, o que motivou a proposta de classificação filogenética do Reino Fungi estabelecida por Hibbett *et al.* (2007).

Abordagens filogenéticas buscam analisar relações de ancestralidade a partir de reconstruções filogenéticas, a fim de permitir discussões a cerca da história evolutiva dos táxons em análise (Felsenstein, 2004). Com a filogenia molecular, tornou-se possível o estudo das relações evolutivas entre espécies, permitindo até estimar o tempo de divergência entre os grupos em associação com eventos geológicos históricos (Sheldon & Bledsoe, 1993; Graur & Li, 2000).

Inicialmente utilizada em estudos de relações hierárquicas (classificação e taxonomia), a filogenética se expandiu, sendo utilizada atualmente com inúmeros objetivos: criar novos grupos taxonômicos, reconstruir filogenias de organismos baseando-se em representantes de diferentes áreas geográficas visando correlação com eventos vicariantes, além de permitir a compreensão da dinâmica de populações (Schneider, 2007).

Estudos filogenéticos visam identificar grupos monofiléticos, ou seja, membros que compartilham um ancestral comum. Estes grupos monofiléticos podem ou não agrupar táxons morfológicamente distintos. Em *Ganoderma*, esse fato passou a ser um grande desafio às classificações até então existentes, principalmente entre espécimes do complexo *G. lucidum* e *G. applanatum-australe* (Kaliyaperumal & Kelaichelvan, 2008; Wang *et al.*, 2009b).

Em filogenia, 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). Desse modo, a amostragem é um passo fundamental, pois uma amostragem insuficiente pode levar a reconstruções e interpretações filogenéticas incorretas, interferindo sensivelmente nas conclusões (Rosenberg & Kumar, 2001).

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).

O termo filogeografia foi inicialmente empregado por Avise (1987) para enquadrar os estudos dos processos que governam as distribuições geográficas de linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies relacionadas. Os estudos

filogeográficos associam a biogeografia, a genética populacional e a filogenia molecular no estudo dos polimorfismos de genes em populações de uma espécie ou entre espécies próximas (Avise *et al.*, 1987; Avise, 1998). Esta forma de abordagem tem sido valiosa para o desenvolvimento de hipóteses sobre processos evolutivos históricos (Binder & Hibbett, 2006; Halling *et al.*, 2008; Geml *et al.*, 2008), pois possibilitam o entendimento da evolução de diferentes linhagens e sua relação com eventos históricos responsáveis por sua diversificação (Avise, 1994).

Estes estudos têm aplicação direta ainda na biologia da conservação, uma vez que descrevem a biodiversidade com base na diversidade genética, fornecendo informações fundamentais para o manejo, embora não definam propriamente as estratégias de conservação (Buchanan, 2001). Porém, o Brasil ainda carece de estudos moleculares com propósitos filogeográficos, e, portanto, maiores estudos nesses aspectos são necessários.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

Para o presente estudo, foram utilizados tanto espécimes de *Ganoderma* frescos (recém-coletados) quanto exemplares que já encontravam depositados nos Herbários URM (UFPE), SP (Instituto de Botânica de São Paulo), INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) e ICN (UFRGS).

Os espécimes frescos foram coletados no Parque Dois Irmãos (Recife, PE), no Refúgio Ecológico Charles Darwin (Igarassu, PE), no Jardim Botânico do Recife (Recife, PE), em áreas reflorestadas da Mineradora Millennium (Mataraca, PB), no Campus da UFV (Universidade Federal de Viçosa, MG) e no Campus da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco, PE), além de exemplares coletados no Parque Ecológico Riacho do Meio (Barbalha, CE), no entorno da Cachoeira de Missão Velha (Missão Velha, CE), no Parque Natural Municipal de Porto Velho (Porto Velho, RO), Campus do INPA (Manaus, AM) e na Reserva Ducke (Manaus, AM) conforme a tabela 1.

Tabela 1. Lista dos espécimes coletados em diferentes áreas do Brasil.

Espécie	Origem	Número de coleta ou de depósito no herbário URM
<i>Ganoderma australe</i> *	Parque Natural Municipal de Porto Velho (Porto Velho, RO)	URM82775
<i>G. australe</i> *	Parque Natural Municipal de Porto Velho (Porto Velho, RO)	URM82776
<i>G. multiplicatum</i> *	Mineradora Millennium (Mataraca, PB)	URM 83346
<i>G. orbiforme</i>	Parque Estadual de Dois Irmãos (Recife, PE)	URM 83331
<i>G. orbiforme</i> *	Parque Estadual de Dois Irmãos (Recife, PE)	URM 83332
<i>G. orbiforme</i>	Parque Estadual de Dois Irmãos (Recife, PE)	URM 83333
<i>G. orbiforme</i> *	Parque Estadual de Dois Irmãos (Recife, PE)	URM 83334
<i>G. orbiforme</i> *	Parque Estadual de Dois Irmãos (Recife, PE)	URM 83335
<i>G. orbiforme</i> *	Parque Estadual de Dois Irmãos (Recife, PE)	URM 83336

<i>G. orbiforme</i>	Parque Estadual de Dois Irmãos (Recife, PE)	URM 83337
<i>G. orbiforme</i>	Parque Estadual de Dois Irmãos (Recife, PE)	URM 83338
<i>G. parvulum*</i>	Campus UFPE (Recife, PE)	URM 83339
<i>G. parvulum*</i>	Campus UFPE (Recife, PE)	URM 83340
<i>G. parvulum</i>	Campus UFPE (Recife, PE)	URM 83341
<i>G. parvulum</i>	Mineradora Millennium (Mataraca, PB)	URM 83342
<i>G. parvulum*</i>	Mineradora Millennium (Mataraca, PB)	URM 83343
<i>G. parvulum*</i>	Parque Ecológico Riacho do Meio (Barbalha, Ceará)	URM 83344
<i>G. parvulum*</i>	Missão Velha (Ceará)	URM 83345
<i>G. resinaceum*</i>	Campus UFPE (Recife, PE)	URM83400
<i>G. tornatum*</i>	Jardim Botânico do Recife (Recife, PE)	URM 83323
<i>G. tornatum</i>	Parque Estadual de Dois Irmãos (Recife, PE)	URM 83324
<i>G. tornatum*</i>	Refúgio Charles Darwin (Igarassu, PE)	URM 83325
<i>G. tornatum*</i>	Mineradora Millennium (Mataraca, PB)	URM 83326
<i>G. tornatum*</i>	Parque Estadual de Dois Irmãos (Recife, PE)	URM 83327
<i>G. tornatum</i>	Jardim Botânico do Recife (Recife, PE)	URM 83328
<i>G. tornatum*</i>	Mineradora Millennium (Mataraca, PB)	URM 83329
<i>G. tornatum*</i>	Campus UFV (Viçosa, MG)	TBG01MG2010
<i>G. tornatum*</i>	Campus INPA (Manaus, AM)	MAJ7143AM
<i>G. tornatum*</i>	Reserva Ducke (Manaus, AM)	TBG01AM2009
<i>Tomophagus colossus*</i>	Mineradora Millennium (Mataraca, PB)	URM 83330

* Espécimes selecionados para sequenciamento das regiões ITS e LSU do DNA ribossomal.

Para comparação, foram selecionados ainda 113 espécimes de *Ganoderma*, representando 20 espécies, depositados nos Herbários ICN, INPA, SP e URM. Estes espécimes foram selecionados de acordo com seu estado de preservação.

Foram utilizadas seis *G. australe* (Fr.) Pat., três *G. applanatum* (Pers.) Pat., um *G. chalconeum* (Cooke) Steyaert, quatro *G. lucidum* (Curtis) P. Karst, um *G. oerstedtii* (Fr.)

Torrend e um *G. resinaceum* Boud. do Herbário ICN, além de quatro *G. australe*, um *G. citriporum* Ryvar den & Iturr., dois *G. multiplicatum* (Mont.) Pat. e treze *G. stipitatum* (Murril) Murril provenientes do herbário INPA.

Já do herbário SP, foram selecionadas 48 amostras, sendo cinco *G. applanatum*, seis *G. australe*, um *G. brownii* (Murrill) Gilb., um *G. concinnum* Ryvar den, um *G. dorsale* (Lloyd) Torrend, cinco *G. lipsiense* (Batsch) G.F. Atk., oito *G. lucidum*, seis *G. multiplicatum*, um *G. orbiforme* (Fr.) Ryvar den, cinco *G. perzonatum* Murrill, um *G. perturbatum* (Lloyd) Torrend, dois *G. resinaceum*, um *G. stipitatum*, dois *G. sessile* Murrill, um *G. sessiliforme* Murrill, um *G. subfornicatum* Murrill e um *G. weberianum* (Bres. & Henn. ex Sacc.) Steyaert.

Do herbário URM, foram utilizados dez *G. australe*, três *G. chaliceum*, quinze *G. stipitatum* (Murrill) Murrill e um *Tomophagus colossus* (Fr.) Murrill.

Uma cultura de *G. resinaceum* depositada na Coleção de Culturas URM coletado em Recife - PE (linhagem 2948), assim como uma de *G. australe* da coleção de culturas HUEFS coletado em Ituberá – BA (C50) também foram utilizadas no presente estudo.

3.2 Herborização e identificação dos espécimes

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 (50 mg) foram retirados das porções mais internas dos mesmos, a fim de evitar a contaminação por microorganismos que pudessem estar nas porções superficiais, e acondicionadas em tubos de 1,5 mL com sílica para desidratação. Em laboratório, esses tubos foram então armazenados em freezer (-20°C) até a extração do DNA.

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 coletados foi realizada com literatura especializada (Ryvar den, 2004) através de análises macro (forma, coloração, superfície abhimenial/himenial, contexto, tubos e margem) e microscópica (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 5% KOH e 1% de

floxina (Teixeira, 1995) e separadamente foi utilizado o reagente de Melzer's (Ryvarden, 1991). Posteriormente, os espécimes foram depositados no herbário URM.

Análises a partir de microscopia de varredura (MEV) foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica (Departamento de Física/UFPE). Fragmentos dos basidiomas secos foram colocados diretamente sobre *stubs* de alumínio usando adesivo de carbono. Os fragmentos foram revestidos com 8–13 nm de ouro usando a Baltec SCD050 e examinado com o microscópio eletrônico JEOL JSM–5900.

3.3 Extração de DNA, amplificação das sequências-alvo e sequenciamento

A extração do DNA genômico dos materiais coletados e dos exemplares depositados nos herbários foi realizada de acordo com Góes-Neto *et al.* (2005) que utiliza tampão CTAB 2% pré-aquecido. Fragmentos de túbulos e contexto (50 mg) foram macerados na presença de nitrogênio líquido em gral de porcelana com auxílio de um pistilo. Posteriormente, em tubos de 1,5 mL, ao produto pulverizado foi adicionado 800 µL tampão CTAB (100 mM Tris–HCl pH 8, 1,4 M NaCl, 2% CTAB, 20 mM EDTA, 1% PVP) (Rogers & Bendich, 1985) e incubado a 65°C de 40 a 60 minutos. Após incubação, o extrato foi lavado com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), precipitado em isopropanol (1:1), lavado com 1 mL de etanol 70% e, por último, ressuscitado em 50 µL de água ultra pura.

As reações de amplificação das regiões ITS1–5.8S–ITS2 (rDNA) foram realizadas em um volume reacional de 25 µL, usando um termociclador (TECHNE TC–512), contendo os seguintes componentes: 1x Tampão KCl, 0.12 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 0.6 pmol/µL de cada *primers*, 0.04 U/µL de Taq Polimerase e aproximadamente 1 ng/µL de DNA molde. Os *primers* ITS1 (5'–TCCGTAGGTGAACCTGCGG–3') e ITS4 (5'–TCCTCCGCTTATTGATATGC–3') (White *et al.*, 1990) foram utilizados. Os parâmetros dos ciclos térmicos basearam-se em Kaliyaperumal e Kalaichelvan (2008), com um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, anelamento dos *primers* a 58°C por 50 s, e extensão a 72°C por 60s, além de um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min.

Para a região LSU foram utilizados os *primers* LR0R (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') e LR07 (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') (Moncalvo *et al.*, 2000) com concentrações dos reagentes e parâmetros de acordo com Góes-Neto *et al.* (2002), que inclui 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. As reações de amplificações em um volume reacional de 25 µL, continham 1x Tampão KCl, 0.2 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 pmol/µL de cada *primers*, 0.04 U/µL de Taq Polimerase e aproximadamente 1 ng/µL de DNA molde.

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 as reações de PCR foram observadas a partir de cinco microlitros do produto final desses dois procedimentos corados com dois microlitros de Gel-red (0,5µg/mL) através de eletroforese em gel de agarose 1%, e visualizado sob luz UV, sendo o resultado documentado por fotografia digital.

Posteriormente, produtos de amplificação das regiões ITS e LSU (rDNA) de 22 espécimes de Ganodermataceae obtidos a partir de amostras frescas indicados na tabela 1, além de outros três espécimes herborizados [um exemplar de *G. chalceum* (URM 80457) coletado no Sítio Carro Quebrado em Triunfo, PE; um de *G. stipitatum* (URM 80765) coletado na estação experimental do IPA em Caruaru, PE; e um de *Tomophagus colossus* (URM 80450) coletado no Vale do Catimbau em Buíque, PE] e os espécimes isolados em meio de cultura [um *G. resinaceum* da Micoteca URM (URM 2948) originário de Recife, PE e um *G. australe* da coleção de culturas da HUEFS (C50) coletado em Ituberá, BA] foram purificados kit PureLink de purificação da Invitrogen e encaminhados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP.

3.4 Alinhamento das sequências e análise filogenética

Os cromatogramas do sequenciamento foram analisados para auxiliar a edição manual das sequências com o auxílio do programa BioEdit (Hall, 1999).

As sequências obtidas foram utilizadas para busca de espécimes de sequências mais similares depositadas no GenBank, tanto para o subg. *Elfvíngia* quanto para o subg. *Ganoderma* (tabela 2), utilizando a ferramenta BLASTn.

Tabela 2. Lista de espécimes de *Ganoderma* cujas sequências das regiões ITS estão depositadas no GenBank e que foram utilizadas nas reconstruções filogenéticas.

Espécie	Origem	Número de Depósito	Número de acesso no GenBank
<i>Amauroderma rude</i> var. <i>intermedium</i>	Taiwan	JMM ASP.1	X78753&X78774
<i>Ganoderma applanatum</i> ¹	Hungria	GYONGYI 0150	AF255092
<i>G. applanatum</i> ¹	Alemanha	CBS 187.31	AF255093
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	Carolina do Norte, EUA	JM97/3	AF255094
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	Carolina do Norte, EUA	JM93/31	AF255098
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	Flórida, EUA	ME-GAN-14	AF255130
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	Flórida, EUA	ME-GAN-24	AF255131/32
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	Porto Rico	RV-PR10	AF255133
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	Costa Rica	JMCR.25	AF255134
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	Costa Rica	JMCR.41	AF255135
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	Costa Rica	JMCR.55	AF255136
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	Costa Rica	JMCR.142	AF255137
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	Costa Rica	JMCR.132	AF255138
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	Costa Rica	JMCR.128	AF255148
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	Equador	MUCL40406	AF255139
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	Equador	MUCL40412	AF255140
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	Guiana Francesa	MUCL40324	AF255141
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	África do Sul	JM98/2	AF255149
<i>G. applanatum</i> cplx ¹	China	JM98/132	AF255115
<i>G. australe</i> cplx ¹	Camboja	MUCL41812	AF255118
<i>G. australe</i> cplx ¹	Tailândia	JM/339	AF255119
<i>G. australe</i> cplx ¹	Tailândia	JM98/19	AF255120
<i>G. australe</i> cplx ¹	Tailândia	JM95/6	AF255121
<i>G. australe</i> cplx ¹	Cingapura	PKB96/270	AF255123/24
<i>G. australe</i> cplx ¹	Papua Nova Guiné	CP302	AF255129
<i>G. australe</i> cplx ¹	Chile	IJFM.A130	AF255172/73
<i>G. australe</i> cplx ¹	Chile	IJFM.A414	AF255174/75
<i>G. boninense</i> ²	Taiwan	RSH RS	X78749/70
<i>G. cupreum</i> ²	Austrália	DFP3896	AJ627586/87
<i>G. cupreum</i> ²	Austrália	DFP4336	AJ627588/09
<i>G. lobatum</i> ¹	Argentina	BAFC651	AF169983/84
<i>G. lobatum</i> ¹	Argentina	BAFC2454	AF169987/8
<i>G. lobatum</i> ¹	Argentina	BAFC2411	AF169989/90

<i>G. lucidum</i> ²	Ibaraki, Japão	WD-565	EU021455
<i>G. lucidum</i> ²	Ibaraki, Japão	WD-2038	EU021456
<i>G. lucidum</i> ²	China	ACCC 5.65	Z87354/64
<i>G. lucidum</i> ²	China	HMAS 60537	Z37050/74
<i>G. lucidum</i> ²	França	CBS 270.81	Z37049/99
<i>G. lucidum</i> ²	Argentina	BAFC 33621	AF170007/08
<i>G. lucidum</i> ²	Estados unidos	CBS 430.84	Z37051/75
<i>G. lucidum</i> ²	Argentina	BAFC 33631	AF170009/10
<i>G. lucidum</i> ²	Noruega	RYV 33217	Z37096/73
<i>G. multipileum</i> ²	Índia	BCRC 36123= ATCC 32471	EU021459
<i>G. multipileum</i> ²	Nantou, Taiwan	BCRC37033	EU021462
<i>G. multipileum</i> ²	Taitung, Taiwan	BCRC37043	EU021460
<i>G. multipileum</i> ²	Pingtung, Taiwan	CWB01740	EU021461
<i>G. multipileum</i> ²	Filipinas	JMM P93-1	X78745/66
<i>G. multipileum</i> ²	Índia	ATCC 32472	X87351/61
<i>G. resinaceum</i> ²	Holanda	CBS 194.76	X78737/58
<i>G. resinaceum</i> ²	Reino Unido	CBS 152.27	Z37062 /85
<i>G. subamboniense</i> var. <i>laevisporum</i> ²	Argentina	ATCC 52419	X78736/57
<i>G. tornatum</i> ¹	Argentina	BAFC1172	AF169975/6
<i>G. tornatum</i> ¹	Argentina	BAFC1139	AF169979/80
<i>G. tornatum</i> ¹	Brasil	BAFC2582	AF169985/86
<i>G. tornatum</i> ¹	Argentina	BAFC2764	AF169993/94
<i>G. tuberculosum</i> ²	Argentina	BAFC 33599	AF170011/12
<i>Tomophagus colossus</i>	Filipinas	CBS 216.36	Z37071/91
<i>T. colossus</i>	Índia	kk-02	AJ749970
<i>T. colossus</i>	Vietnã	ANH s.n.(=TRTC 157076	JN184395
<i>T. colossus</i>	Vietnã	HCMC10 (TRTC 161190)	JN184396
<i>T. cattienensis</i>	Vietnã	CT99 (TRTC 161191)	JN184397
<i>T. cattienensis</i>	Vietnã	CT119	JN184398

cplx = complexo; 1 = espécimes pertencentes ao subg. *Elfvigia*; 2 = espécimes pertencentes ao subg. *Ganoderma*.

Os alinhamentos foram realizados com a utilização do programa ClustalX (Larkin *et al.*, 2007). Posteriormente foram reeditados no BioEdit (Hall, 1999), removendo a região 5.8S (rDNA), e por fim realinhados no ClustalX.

As árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de neighbor joining (NJ) e de máxima parcimônia (MP), com 1000 reamostragens de *bootstrap* utilizando o programa PAUP versão 4 (Swofford, 2003). Para as análises pelo método de neighbor joining (NJ) foram utilizadas os parâmetros obtidos pelo ModelTest 3.7 (Posada & Crandall, 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração do DNA Genômico e Amplificações das Regiões-Alvo

A partir da extração de DNA dos fragmentos de basidiomas frescos (posteriormente armazenados na presença de sílica e congelados) e de isolados em meio de cultura obteve-se DNA de boa qualidade com bandas de DNA íntegro e de alto peso molecular (cerca de 20.000 pb).

Da extração 113 exemplares herborizados, em apenas em três espécimes de *G. australe* (ICN 154138, URM 81388 e URM 81390), um de *G. chalceum* (URM 80457), um de *G. marmoratum* (ICN 102460), dois de *G. resinaceum* (ICN 154159 e SP 375898), um de *G. stipitatum* (URM 80765) e um de *T. colossus* (URM 80450) também foram visualizadas bandas de DNA, porém de baixo a médio peso molecular (100 a 700 pb).

Naturalmente, a experiência demonstra que a utilização de material fresco é o ideal para a realização de estudos moleculares (Sytsma *et al.* 1993), uma vez que a obtenção de DNA de boa qualidade é um passo fundamental para o sucesso de qualquer análise genética (Feres *et al.*, 2005). Como a maioria dos materiais herborizados selecionados para extração de DNA foi depositada nos herbários entre 1970 e 2000, a obtenção de DNA genômico desses exemplares foi comprometida.

O produto das extrações do DNA da maioria das amostras mostrou-se pigmentado, com coloração variando de hialina a amarronzada, porém translúcidos (tabela 3). Todas as amostras que apresentaram bandas de alto peso molecular, os extratos mesmo pigmentados, tiveram as regiões ITS e LSU (rDNA) amplificadas com sucesso.

Tabela 3. Coloração do produto de extração do DNA genômico e diluição necessária para amplificação das regiões ITS e LSU dos espécimes cujos *amplicons* foram enviados para sequenciamento.

Espécie	Número de coleta ou de depósito no herbário URM	Coloração do produto de extração ^a	Diluição para amplificação (ITS e LSU)
<i>G. australe</i>	URM82775	M	10 ⁻²
<i>G. australe</i>	URM82776	M	10 ⁻³
<i>G. australe</i>	C50#	H	10 ⁻³
<i>G. chalceum</i>	URM 80457	A	10 ⁻²
<i>G. multiplicatum</i>	URM 83346	A	10 ⁻²
<i>G. orbiforme</i>	URM 83332	A	5x10 ⁻³
<i>G. orbiforme</i>	URM 83334	M	10 ⁻³
<i>G. orbiforme</i>	URM 83335	M	10 ⁻³

<i>G. orbiforme</i>	URM 83336	A	10 ⁻³
<i>G. parvulum</i>	URM 83339	H	10 ⁻³
<i>G. parvulum</i>	URM 83340	H	10 ⁻³
<i>G. parvulum</i>	URM 83343	A	10 ⁻³
<i>G. parvulum</i>	URM 83344	A	10 ⁻²
<i>G. parvulum</i>	URM 83345	A	10 ⁻²
<i>G. resinaceum</i>	URM83400	A	10 ⁻³
<i>G. resinaceum</i>	URM2948*	H	10 ⁻⁴ /10 ⁻³
<i>G. stipitatum</i>	URM80765	A	10 ⁻¹
<i>G. tornatum</i>	URM 83323	M	10 ⁻³
<i>G. tornatum</i>	URM 83325	A	10 ⁻²
<i>G. tornatum</i>	URM 83326	M	10 ⁻³
<i>G. tornatum</i>	URM 83327	A	10 ⁻³
<i>G. tornatum</i>	URM 83329	A	10 ⁻²
<i>G. tornatum</i>	TBG01MG 2010	M	10 ⁻⁴ /10 ⁻³
<i>G. tornatum</i>	MAJ7143AM 2011	A	10 ⁻³
<i>G. tornatum</i>	TBG01AM 2009	A	10 ⁻²
<i>Tomophagus colossus</i>	URM 80450	A	10 ⁻¹
<i>T. colossus</i>	URM 83330	A	10 ⁻²

*Coleção de Culturas URM, #Coleção de Culturas HUEFS, ^a H – hialina; A - amarelado, porém translúcido; M – amarronzado, mas ainda translúcido.

Muitos cuidados são necessários durante a extração do DNA, pois fungos produzem inúmeros polissacarídeos e compostos secundários como fenóis que podem resultar na degradação do DNA genômico (Rogers, 1994; Góes-Neto *et al.*, 2005), além de inibir a ação da *Taq* polimerase durante as reações de PCR se não forem, pelo menos, parcialmente eliminados (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Fungaro, 2000).

Das amostras provenientes dos herbários e que apresentaram DNA de baixa qualidade, apenas três amostras tiveram as regiões ITS e LSU amplificadas com sucesso [*G. chalconum* (URM 80457), *G. stipitatum* (URM 80765) e *T. colossus* (URM 80450)]. No entanto, de um espécime de *G. australe* (URM 81390), obteve-se êxito na amplificação apenas das regiões ITS e, por isso, os *amplicons* não foram enviados para sequenciamento, pois uma das propostas do trabalho era a análise combinada das sequências de nucleotídeos das regiões ITS e LSU.

Conforme relatado por Góes-Neto *et al.* (2005) e confirmado neste trabalho, produtos de extração com bandas de baixo peso molecular podem ser amplificadas em

reações de PCR em alguns casos, principalmente se a região de interesse não for muito longa, como é o caso das regiões ITS (Fungaro, 2000).

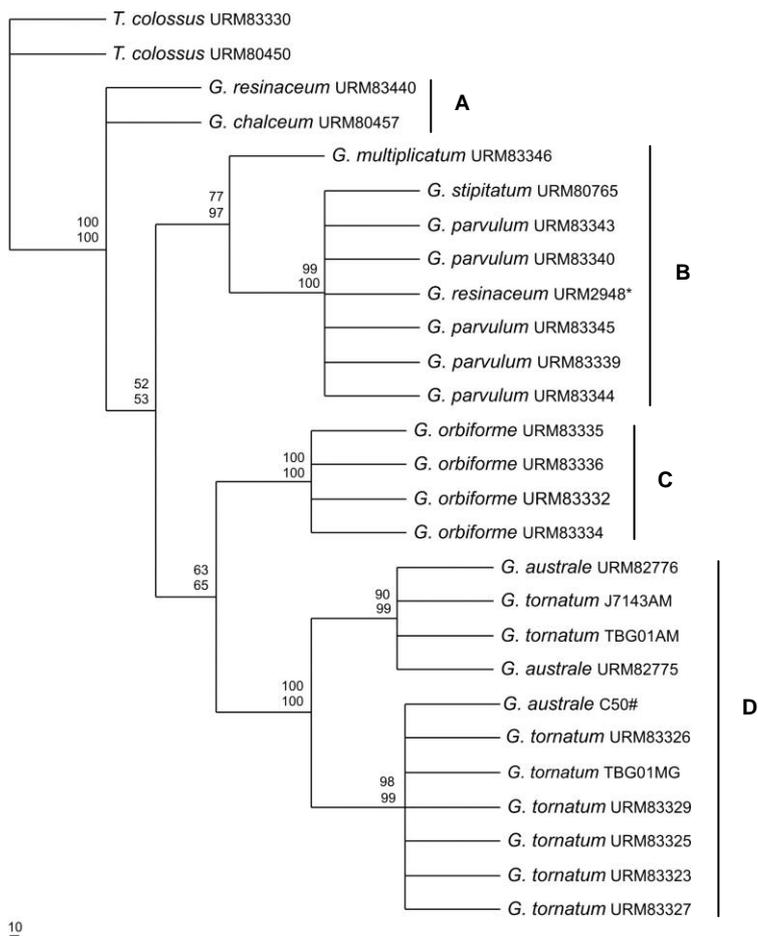
Em geral, para o sucesso das ampliações das sequências-alvo por PCR foram necessárias diluições dos extratos originais que variaram de 10^{-1} a 10^{-4} (tabela 3). Este resultado está de acordo com relatos da literatura cujos trabalhos utilizaram protocolos de extração de DNA semelhantes (Wagner & Fischer, 2002; Góes-Neto *et al.*, 2005).

De modo geral, os compostos responsáveis pela pigmentação das amostras não comprometeu diretamente os procedimentos de ampliações, exceto para duas amostras de *G. australe* (URM 82775 e URM 82776) que apresentaram baixa intensidade de brilho nas bandas relativas a seus produtos de amplificação, mesmo em diferentes diluições. Essas amostras apresentaram extratos de coloração amarronzada e aparentemente os compostos responsáveis por esta pigmentação afetaram as reações de PCR.

4.2 Taxonomia Molecular de *Ganoderma*: Regiões ITS ou LSU?

A partir da análise combinada das sequências das regiões ITS e da região LSU, uma matriz de dados com 25 sequências de *Ganoderma* e com duas de *Tomophagus colossus* foi construída, o que resultou em 1.748 sítios de alinhamento. Destes, 1.605 caracteres foram constantes (91.8%) e 143 foram variáveis (8.2%), porém, destes últimos, 120 foram parcimoniosos informativos (6.86%).

As árvores filogenéticas obtidas pela análise conjunta das regiões ITS e LSU através do método de neighbor joining (NJ) com as distâncias de Kimura 2-parâmetros e do método de máxima parcimônia (MP) apresentaram pequenas divergências nos valores de *bootstrap*, porém com mesma topologia geral entre si (Fig. 1). Observa-se que *Ganoderma* é grupo monofilético em Ganodermataceae, conforme defendido por inúmeros pesquisadores (Moncalvo *et al.*, 2005a; Wang *et al.*, 2009b). No presente trabalho, quatro clados foram considerados (A, B, C e D).



10

Fig.4. Reconstrução filogenética do gênero *Ganoderma* a partir do alinhamento de 1.748 nucleotídeos relativos à combinação dos fragmentos ITS I + ITS II+ LSU (rDNA). Valores de *bootstrap* (em %) foram gerados a partir do método de máxima parcimônia e de método neighbor joining com as distâncias de Kimura 2-parâmetros (1000 *bootstraps*), respectivamente, e somente valores acima de 50% são apresentados. Dois exemplares de *Tomophagus colossus* foram utilizados como grupo externo. Índice de Consistência = 0.7913 e Índice de Retenção = 0.843). *Coleção de Culturas URM; #Coleção de Culturas HUEFS.

Para efeito de estudo, no primeiro agrupamento (A) foram alocados um espécime de *G. resinaceum* (URM 83340) e o exemplar de *G. chalceum* (URM 80457). O clado B foi formado por um espécime de *G. multiplicatum*, cinco exemplares de *G. parvulum* (URM 83339, URM 83340, URM 83343, URM 83344 e URM 83345), um de *G. resinaceum* (URM 2948) e um *G. stipitatum* (URM 80765), embora *G. multiplicatum* tenha se apresentado distinto em relação aos demais. No clado C, foram agrupados todos os representantes de *G. orbiforme* (URM 83332, URM 83334, URM 83335 e URM 83336) e, no clado D, alocaram-se todos os espécimes pertencentes ao subg. *Elfvigia*, representado por *G. australe* (URM 82775, URM 82776 e C50) e *G. tornatum* (URM 83326, URM 83326, URM 83325, URM 83323, URM 83327, J7143AM2011, TBG01AM2009 e TBG01MG2010).

Historicamente, por *Ganoderma* ter sido dividido em dois subgêneros [*Elfvigia* (complexo *Ganoderma applanatum-australe*) e *Ganoderma* (complexo *Ganoderma lucidum*)] (Gottlieb *et al.*, 1999a, b), maiores discussões acerca dos conceitos e diferenciações entre as espécies serão realizadas em seções individualizadas (4.3 e 4.4). No entanto, baseado em espécimes exclusivamente do Brasil, observa-se que *Ganoderma* trata-se de um grupo monofilético, assim como o subg. *Elfvigia* (clado D). No entanto, o mesmo não se pode afirmar para o subg. *Ganoderma* (clados A, B e C).

De modo geral, a reconstrução filogenética realizada a partir da análise combinada dos fragmentos das regiões ITS e LSU (rDNA) foram capazes de delimitar espécies. Utilizando-se também de fragmentos dessas regiões (ITS e D2-LSU), Moncalvo *et al.* (1995a) também obtiveram diferenciações entre táxons, porém com base em espécimes europeus. Atualmente, existe um consenso de que comparações de múltiplas filogenias gênicas é a forma mais adequada para avaliar os limites das espécies (Taylor *et al.*, 2000) e a utilização de mais de um fragmento de DNA vem sendo cada vez mais utilizada (Hong & Jung, 2004; Jeong *et al.*, 2005; Hibbett *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2008).

Além da análise combinada entre as regiões ITS e LSU, foram realizadas outras duas reconstruções filogenéticas (Fig. 5), uma utilizando dados relativos à análise exclusiva das sequências das regiões ITS (ITS I e ITS II), representado por R.1, e outra a partir das sequências relativas à região LSU (R.2).

O tamanho da região ITS I entre os espécimes de *Ganoderma* estudados não diferiu acentuadamente, apresentando de 197 a 204 nucleotídeos e foram alinhadas em 211 posições. Esta pequena variação também foi observada para a região ITS II que apresentou entre 193 e 204 nucleotídeos e que foram alinhadas em 205 posições. Este resultado está de acordo com o que já foi descrito para gênero (Moncalvo *et al.*, 1995a; Gottlieb *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2009b).

Desse modo, a matriz das sequências resultantes da combinação da região ITS I com a ITS II dos espécimes em estudo incluíram 416 sítios de alinhamento. Destes, 309 foram constantes (74.2%) e 107 foram caracteres variáveis (25.7%), porém 104 parcimoniosos informativos (25%).

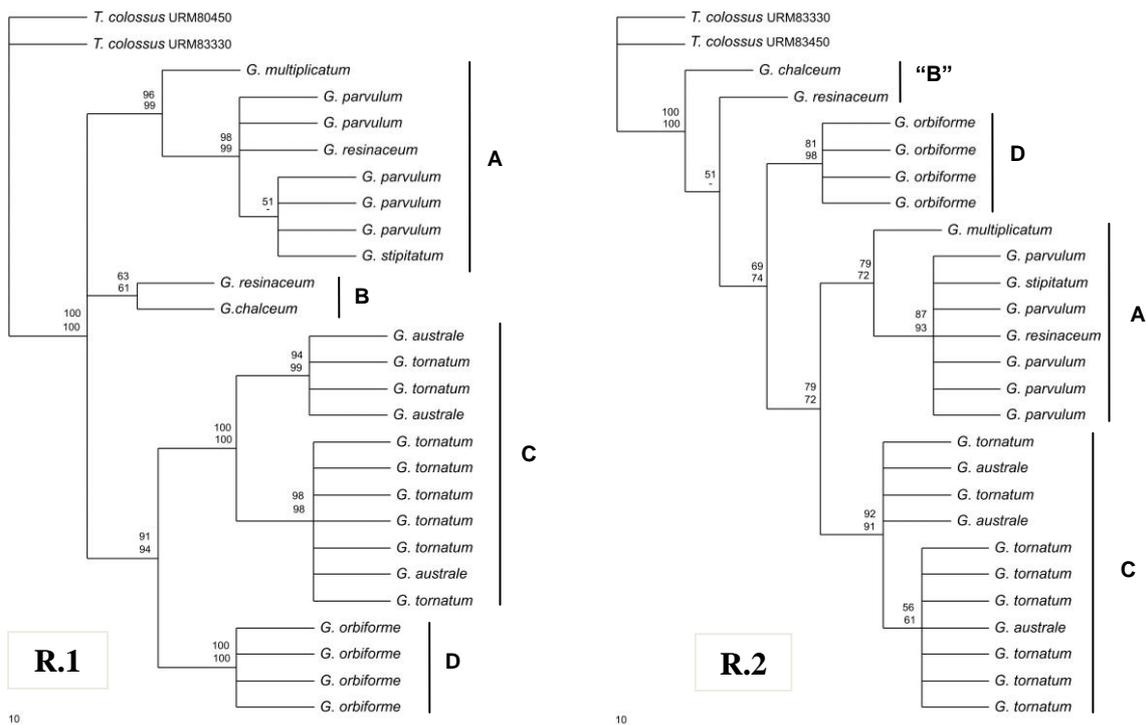


Fig. 5. Reconstruções filogenéticas de *Ganoderma* obtidas a partir do alinhamento de 416 nucleotídeos relativos às regiões ITS I e II (**R.1**) e de 1326 nucleotídeos da região LSU (**R.2**), respectivamente. Valores de *bootstrap* (em %) foram gerados a partir do método de máxima parcimônia e de método neighbor joining com as distâncias de Kimura 2-parâmetros (1000 *bootstraps*), respectivamente, e somente valores acima de 50% são apresentados. Dois exemplares de *Tomophagus colossus* foram utilizados como grupo externo. **R.1**: Índice de Consistência (IC) = 0.8125 e Índice de Retenção (IR) = 0.9461; **R.2**: IC = 0.8824 e IR = 0.9439.

Analisando a árvore filogenética R.1 (ITS I + ITS II), observa-se a formação de quatro agrupamentos principais (A, B, C e D) que foram corroborados pela reconstrução filogenética R.2 (LSU), exceto em relação ao agrupamento B. Embora possuam agrupamentos semelhantes, estas reconstruções apresentam topologias distintas entre si.

De todo modo, estes resultados demonstram que para os táxons analisados, as árvores filogenéticas geradas a partir da combinação das regiões ITS e LSU ou a partir de dados relativos apenas às regiões ITS ou à região LSU são capazes de fornecer agrupamentos e distinções semelhantes entre si, podendo ambas as regiões do rDNA (isoladamente ou combinadas) serem utilizadas com propósitos taxonômicos.

Embora o monofiletismo do gênero *Ganoderma* e o do subg. *Elfvíngia* sejam suportados com confiança (acima de 90% de *bootstrap*), o mesmo não se pode afirmar em relação ao subgênero *Ganoderma* (Fig. 5- clados A, B e D).

A separação histórica de *Ganoderma* baseada na presença ou não de superfície abhimental lacada, subg. *Ganoderma* e subg. *Elfvíngia*, respectivamente, não

correspondem a agrupamentos monofiléticos nas reconstruções filogenéticas até aqui apresentadas (Fig. 4 e 5). Apesar de vários autores mencionarem o monofiletismo para esses subgêneros, estes são suportados por baixos valores de *bootstrap*. Por exemplo, num amplo estudo do subg. *Elfvíngia* utilizando espécimes de todos os continentes, o monofiletismo do grupo foi suportado por apenas 56% de *bootstrap* pelo método de máxima parcimônia (Moncalvo & Buchanan, 2008), e de modo similar, Wang *et al.* (2009) obtiveram o monofiletismo do subg. *Ganoderma* suportado por 63% de *bootstrap* também pelo método de máxima parcimônia.

Embora seja utilizado como caracter básico nas chaves de identificação de *Ganoderma*, a presença de píleo levemente lacado em espécimes de *G. applanatum* (espécie-tipo do subg. *Elfvíngia*) demonstra que esse caracter deve ser analisado com cautela (Furtado, 1965a).

Observando a topologia da árvore filogenética baseada exclusivamente em sequências das regiões ITS, nota-se que esta é a que mais se assemelha à da combinação ITS I + ITS II + LSU. Isto pode ser explicado pelo fato das regiões ITS concentrarem a maior quantidade de caracteres variáveis parcimoniosos informativos (80.8% do total relativo a ITS I + ITS II + LSU). Neste estudo, embora a matriz de sequências da região LSU tenha alinhado em 1.326 posições, apenas 23 eram de caracteres variáveis parcimoniosos informativos, quantidade menor, que a quantidade de informações relevantes da região ITS I (47 caracteres). Dos 23 caracteres que eram variáveis parcimoniosos informativos observados na região LSU, 11 encontravam-se no Domínio Divergente 2, trecho já mencionado como o mais variável para a região (Hopple & Vilgalys, 1999).

Devido as regiões ITS possuírem alta variação interespecífica, estas são as mais popularmente utilizadas para discriminar espécies proximamente relacionadas (Chen *et al.*, 2001; Rouland-Lefevre *et al.*, 2002; Nilsson *et al.*, 2009), embora a região LSU, mesmo menos variável, também seja utilizada para a comparações ao nível específico. Por exemplo, distinções no agrupamento B só podem ser observadas a partir das reconstruções que se utilizaram da região LSU.

Por espécimes de *Ganoderma* possuírem uma grande quantidade de sequências de *Ganoderma* disponíveis nos bancos de dados do NCBI para as regiões ITS, as análises filogenéticas individualizadas relativas aos subgêneros *Ganoderma* e *Elfvíngia*, respectivamente, serão realizadas baseadas nessa região do rDNA. De todos os 55

espécimes cujas sequências das regiões ITS foram selecionadas do GenBank (22 para *Ganoderma* e 33 para *Elfvíngia*), apenas um desses espécimes também possui fragmento sequenciado e compatível com o tamanho das sequências obtidas no presente estudo para a região LSU (entre 1.318 a 1.320 nucleotídeos).

4.3 Análise Filogenética do subg. *Ganoderma*

A matriz de dados com 37 sequências de *Ganoderma* relativas às regiões ITS foi alinhada em conjunto com uma de *Amauroderma* e oito de *Tomophagus* (grupo externo) e incluiu 420 sítios. Destes, 270 foram constantes e 150 foram caracteres variáveis, porém 120 parcimoniosos informativos. Os resultados das análises filogenéticas obtidas a partir dos métodos de NJ e de MP apresentaram pequena divergência nos valores de *bootstrap* e praticamente mesma topologia entre si (Fig. 6). Observa-se que este subgênero forma um grupo monofilético em Ganodermataceae, porém com baixo suporte estatístico (MP 68%). Para simplificar a discussão, nove clados foram considerados (A, B, C, D, E, F, G, H e I).

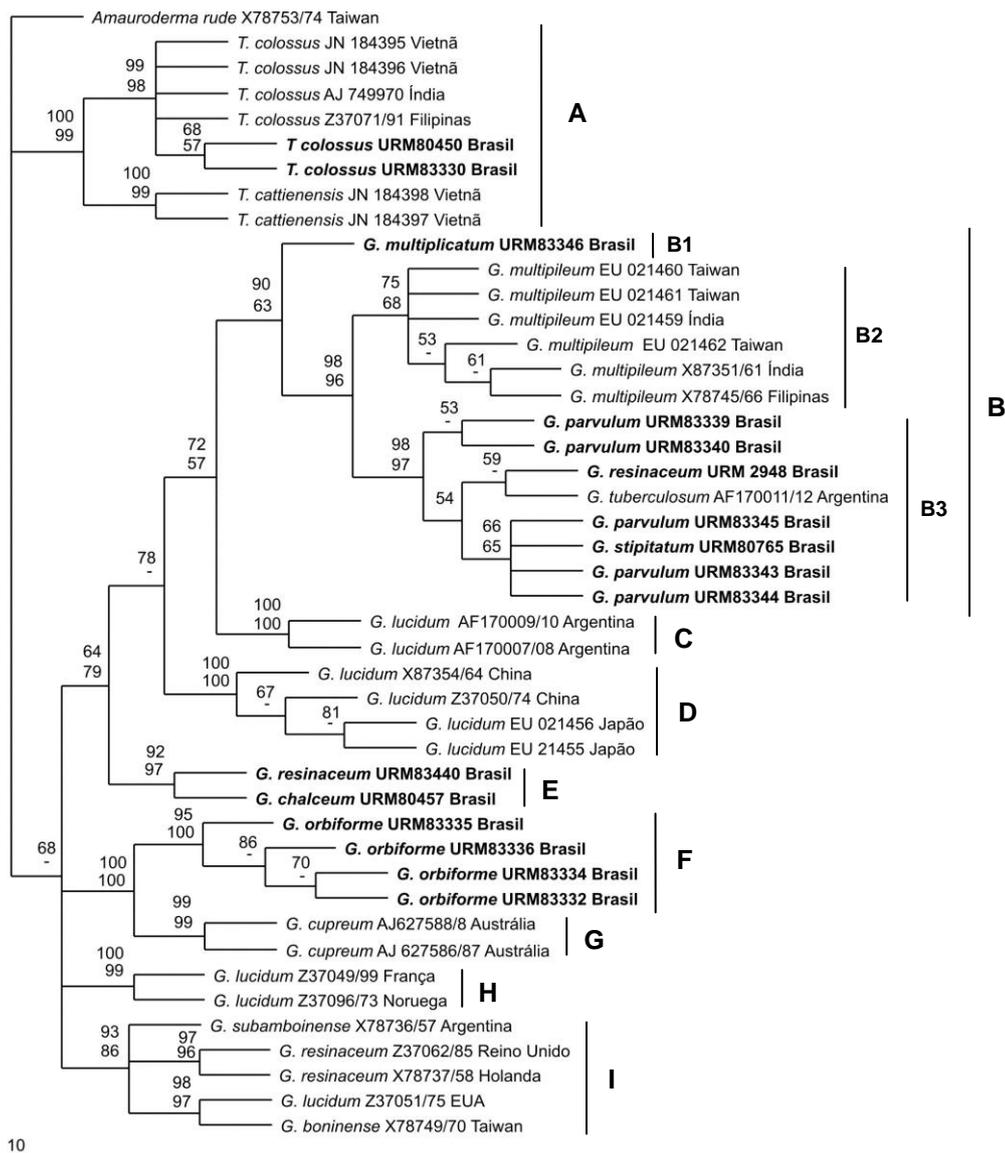


Fig. 6. Reconstrução filogenética do subg. *Ganoderma* obtida a partir do alinhamento em 420 sítios relativos às regiões ITS (ITSI + ITSII). Valores de *bootstrap* (em %) foram gerados a partir do método de método neighbor joining com as distâncias de Kimura 2-parâmetros e pelo método de máxima parcimônia (1000 *bootstraps*), respectivamente, e somente valores acima de 50% são apresentados. Um exemplar de *Amauroderma rude* e dois de *Tomophagus colossus* (URM 80450 e URM 83330) foram utilizados como grupo externo. Índice de Consistência = 0.669 e Índice de Retenção = 0.8916.

O clado A foi formado com alto suporte estatístico (MP 100% e NJ 99%) por duas espécies de *Tomophagus* e estas se apresentaram distantemente relacionadas em relação aos representantes de *Ganoderma*, confirmando seu status de gênero. A criação do gênero *Tomophagus* foi primeiramente abordada por Murrill (1995b) e posteriormente confirmado pelos estudos filogenéticos de Hong & Jung (2004) e Tham *et al.* (2011).

O gênero *Tomophagus* caracteriza-se por apresentar superfície lacada amarelada, muitos clamidosporos, hifas do contexto ligeiramente dextrinóides e basidiosporos bem

maiores que os demais representantes de *Ganoderma* (Ryvarden, 2004). Entretanto, o Index Fungorum (www.indexfungorum.org/names) ainda considera *Tomophagus* como sinônimo de *Ganoderma*, ao contrário do MycoBank (<http://www.mycobank.org>) e do CBS (<http://www.cbs.knaw.nl>).

Observa-se que os exemplares de *T. colossus* de origem brasileira (Fig. 7) agruparam-se com os demais representantes da espécie de origem asiática com alto suporte estatístico (MP 99% e NJ 98%), demonstrando serem, de fato, representantes da mesma espécie. Já os dois representantes de *T. cattienensis* apresentaram-se como espécie distinta de *T. colossus* (MP 100% e NJ 99%).

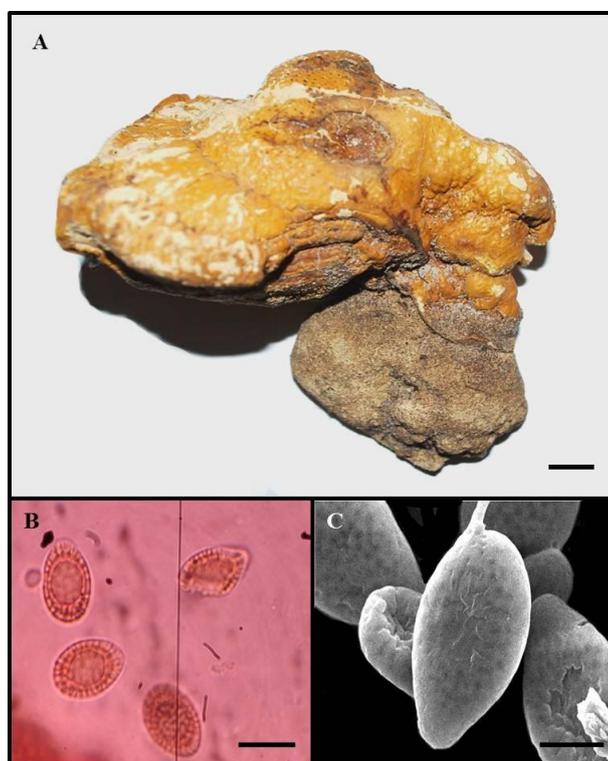


Fig. 7. *Tomophagus colossus* (URM 83330). **A.** Basidioma. **B-C.** Basidiosporos. Escala: A = 1 cm; B= 10 μ m; C = 5 μ m.

Espécimes de *T. colossus* diferenciam-se morfológicamente por possuírem basidiomas de coloração amarelada, ao contrário dos representantes de *T. cattienensis* que possuem basidiomas brilhantes com coloração variando de vermelho a marrom claro; possuem contexto de coloração branca cremosa permanente ao invés de marrom pálido quando seco como ocorre em *T. cattienensis*; além de possuírem basidiosporos ligeiramente menores (14-20 x 9-14 μ m contra 17,5-21,5 x 11,5-14,5 μ m em *T. cattienensis*) (Tham *et al.*, 2011).

No clado B, agruparam-se o exemplar de *G. multiplicatum* (B1), os de *G. multipileum* (B2), um de *G. resinaceum*, um de *G. stipitatum* e um de *G. tuberculosum*, além todos os espécimes de *G. parvulum* (B3). Desse modo, observa-se que *G. multiplicatum* (Fig. 8) apresentou-se como uma espécie distinta em relação aos demais representantes do clado. Esta distinção também é sustentada pelas reconstruções baseadas nas sequências da região LSU (Figs. 5 e 6). Ryvar den (2000) reconheceu essa espécie como sinônima de *G. subamboinense* Henn. No entanto, observa-se que o representante de *G. subamboinense* incluído na reconstrução filogenética (clado I) apresentou-se distantemente relacionado em relação a *G. multiplicatum*.

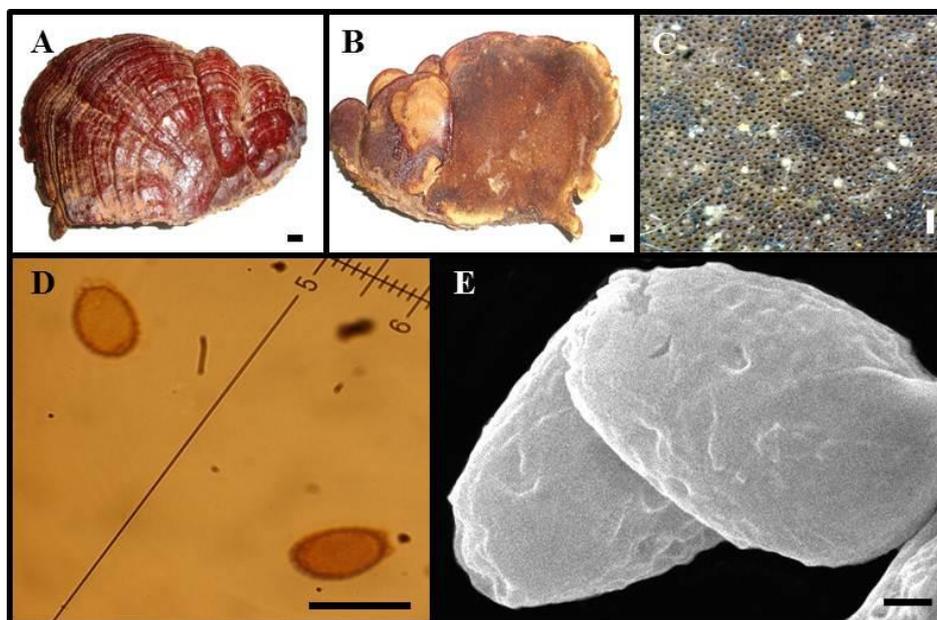


Fig. 8. *Ganoderma multiplicatum* (URM 83346). **A-B**. Basidioma. **C**. Superfície himenial. **D-E**. Basidiosporos. Escala: A-B = 1cm; C= 1mm; D = 10 μ m; E = 1 μ m.

No suclado B3, alocaram-se todos os representantes de *G. parvulum*, um de *G. resinaceum*, um de *G. stipitatum* e um de *G. tuberculosum*. Durante muito tempo, *G. parvulum* foi considerado sinônimo de *G. stipitatum* (Moncalvo & Ryvar den, 1997; Ryvar den, 2004). Embora concordemos que se tratem da mesma espécie, *G. parvulum* (Fig. 9) é o nome prioritário e, portanto, o que deve ser utilizado (Torres-Torres *et al.* 2011).

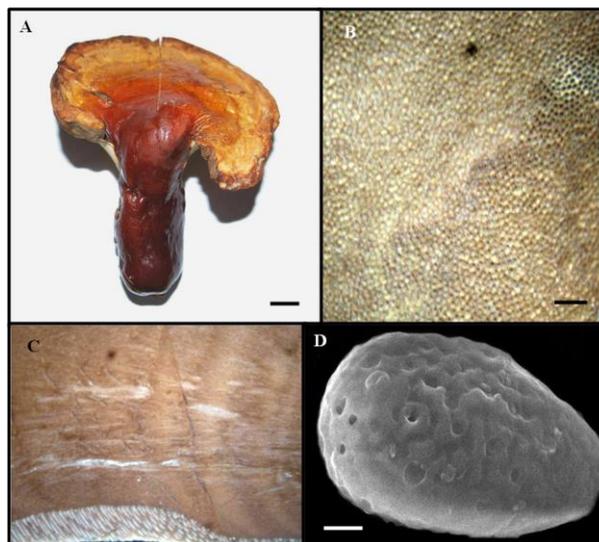


Fig. 9. *Ganoderma parvulum* (URM 83342). A. Basidioma. B. Superfície himenial. C. Presença de depósitos resináceos no contexto. D. Basidiosporo. Escala: A = 1cm; B = 1 mm ; D = 1 μ m.

Já o exemplar identificado como *G. resinaceum* (B3), obtido da Coleção de Culturas URM, provavelmente se trata de *G. parvulum*. Contudo, o exemplar de *G. resinaceum* que originou a linhagem não foi depositado em nenhum herbário, impossibilitando a reidentificação desse material. Essas duas espécies são morfológicamente semelhantes, tanto macro- quanto microscopicamente. Entretanto, *G. resinaceum* não apresenta linhas resináceas no contexto (Ryvarden, 2004). De todo modo, pela reconstrução filogenética, observa-se que esse espécime deva realmente se tratar de *G. parvulum*. O mesmo pode se aplicar ao espécime argentino descrito como *G. tuberculosum* que se caracteriza por possuir depósitos resináceos no contexto, assim como *G. parvulum* (Gottlieb & Wright, 2000). *G. stipitatum* (= *G. parvulum*) possuem basidiosporos menores (7-9.5 μ m de comprimento) em relação a *G. resinaceum* (9-11.5 μ m), assim como *G. tuberculosum* (10-12 μ m). Aparentemente o tamanho dos basidiosporos não é um caracter importante para a delimitação dessas espécies e sim a presença de depósitos resináceos no contexto.

O exemplar de *G. tuberculosum* incluído no presente estudo foi preliminarmente identificado como *G. resinaceum* por Gottlieb *et al.* (1999a). No entanto, estes autores mencionaram que “*G. resinaceum*” é um nome duvidoso para espécimes da região, e por isso, este espécime teve sua nomenclatura revista e corrigida para *G. tuberculosum*.

De todo modo, os exemplares considerados *G. parvulum* e *G. multiplicatum* apresentaram-se distintos em relação aos espécimes identificados como *G. lucidum*, seja para a Argentina (clado C), países asiáticos (clado D), Europa (H) e América do Norte

(clado I). Devido à alta plasticidade fenotípica do subg. *Ganoderma*, inúmeras espécies são confundidas com *G. lucidum*, sendo por isso considerada um complexo de espécies. Contudo, acredita-se que *G. lucidum* stricto sensu seja uma espécie restrita a Europa (Moncalvo & Ryvarden, 1997) e, desse modo, os exemplares não europeus identificados como *G. lucidum* (clados C, D e I) devem corresponder a, no mínimo, outras três espécies.

A partir da combinação de dados morfológicos e moleculares, Wang *et al.* (2009b) observaram que os exemplares asiáticos (B2) identificados como *G. lucidum* por Moncalvo *et al.* (1995a, b), na verdade, tratavam-se de representantes de *G. multipileum*, uma espécie tipicamente asiática. De modo semelhante, estudos devem ser realizados com exemplares não europeus observados nos agrupamentos C, D e I, a fim de verificar sua real nomenclatura.

O espécime de *G. chalceum* (Fig. 10) originário do Brasil foi alocado no mesmo agrupamento (E) de um exemplar de *G. resinaceum* também do Brasil. No entanto, este agrupamento não foi observado nas reconstruções filogenéticas baseadas em sequências da região LSU [Fig. 4 (ITS+LSU) e Fig. 5 - R2 (LSU)], apresentando-se como espécies distintas. Este resultado demonstra a importância de se estudar mais de uma região do DNA em inferências filogenéticas.

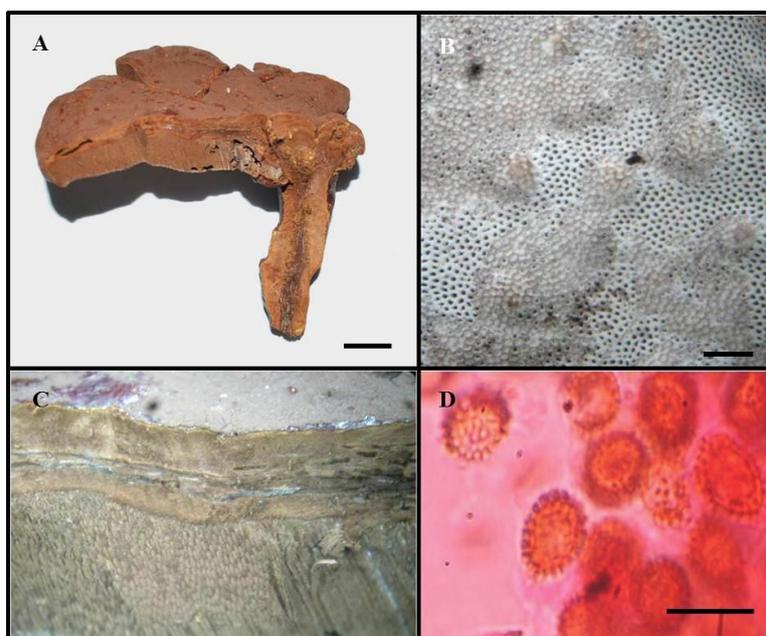


Fig. 10. *Ganoderma chalceum* (URM 80457). **A.** Basidioma. **B.** Superfície himenial. **C.** Presença de linha resinácea no contexto. **D.** Basidiosporos. Escala: A = 1cm; B = 1mm; D = 10 μ m.

Ganoderma chalceum distingue-se de *G. resinaceum* por possuir linhas resináceas no contexto (Fig. 11-C), embora sejam microscopicamente idênticos. Ambas as espécies possuem células da cutícula lisa e em paliçada e tamanho semelhantes de basidiosporos (*G. chalceum* de 10 a 12 μm e *G. resinaceum* de 10 a 11 μm) (Ryvarden, 2004). Assim como discutido no clado B, a presença de depósitos resináceos no contexto parece ser mais relevante que o tamanho dos basidiosporos para a delimitação dessas espécies. Porém, para melhor discussão sobre a delimitação de *G. chalceum* e *G. resinaceum*, é necessária uma maior quantidade de espécimes, pois uma amostragem insuficiente limita a obtenção de resultados conclusivos e pode ser uma fonte de interpretações filogenéticas incorretas (Rosenberg & Kumar, 2001). Além disso, espécime-tipo de *G. resinaceum* é de origem européia e o uso deste nome para exemplares brasileiros pode não ser o mais adequado, uma vez que espécimes de *G. resinaceum* de origem européia (clado I) apresentaram-se distantemente relacionados com o espécime brasileiro de “*G. resinaceum*” (clado E).

Todos os representantes de *G. orbiforme* agruparam-se com alto suporte estatístico (MP 95% e NJ 100%) no clado F e distinto dos demais representantes analisados. Esta espécie possui células terminais da cutícula tuberculadas e fortemente amilóides, semelhantes a *G. multiplicatum* (B2). Porém, *G. orbiforme* diferenciam-se por possuir basidiosporos maiores (10-11 μm , 7-8 μm em *G. multiplicatum*).

Embora *G. orbiforme* possua depósitos resináceos similares a *G. parvulum* (= *G. stipitatum*) (B3), *G. orbiforme* possui basidiosporos maiores (10-11 μm , 7-9.5 μm em *G. parvulum*) e células da cutícula distinta (lisas com raras protuberâncias em *G. parvulum*).

Ganoderma orbiforme foi reconhecida como sinônimo para *G. boninense* (clado I) pelo CBS, Index Fungorum e MycoBank, espécie esta de distribuição asiática. No entanto, o presente trabalho evidencia a distinção entre essas duas espécies.

Do mesmo modo, o CBS, Index Fungorum e MycoBank, consideram *G. cupreum* (clado G) como sinônimo de *G. chalceum* (clado E). No entanto, observa-se no presente estudo que essas espécies são distintas e distantemente relacionadas entre si.

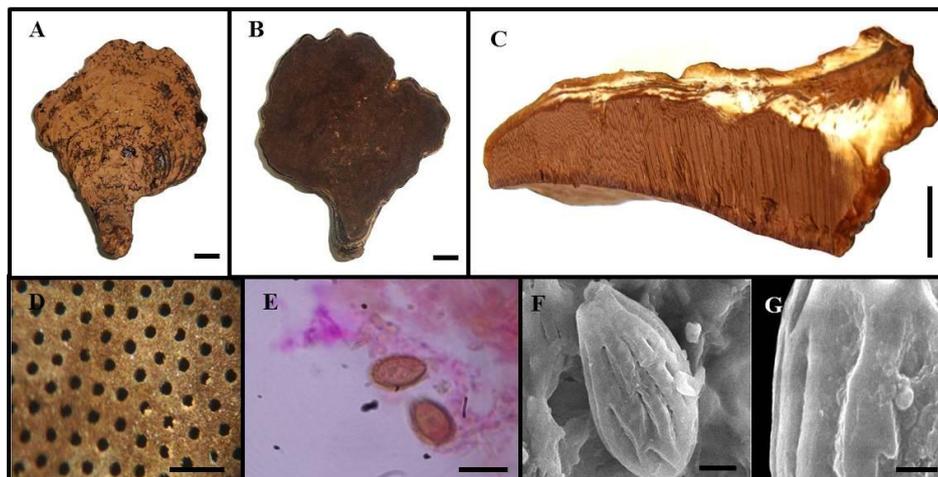


Fig. 11. *Ganoderma orbiforme* (URM 83335). **A-B** Basidioma. **C**. Contexto. **D**. Superfície himenial. **E-F**. Basidiosporos. **G**. Ornamentação dos basidiosporos em MEV. Escala: A-B = 1cm; C= 1cm; D=1mm; E = 10 μ m; F = 2 μ m; G = 2 μ m.

Esses resultados demonstram a utilidade das regiões ITS, associadas aos métodos tradicionais, nos estudos taxonômicos do subg. *Ganoderma* e sua importância para uma identificação mais confiável das espécies.

4.4 Análise filogenética do subg. *Elfvíngia*

Para a reconstrução filogenética do subg. *Elfvíngia* a partir da análise exclusiva das regiões ITS foram utilizadas uma sequência de *T. colossus* (URM 83330) e uma de *G. parvulum* (URM83343) como grupo externo em conjunto com 44 sequências de representantes do subgênero (33 recuperadas do GenBank). Esta matriz de dados apresentou 398 posições alinhamento com 315 caracteres constantes e 83 variáveis. Destes, 75 foram de caracteres variáveis parcimoniosos informativos. A árvore filogenética relativa a esses dados (Fig. 12) aponta que *Elfvíngia* trata-se de um grupo monofilético (MP 100% e NJ 100%). Para efeito de estudo, cinco agrupamentos foram reconhecidos (A, B, C, D e E).

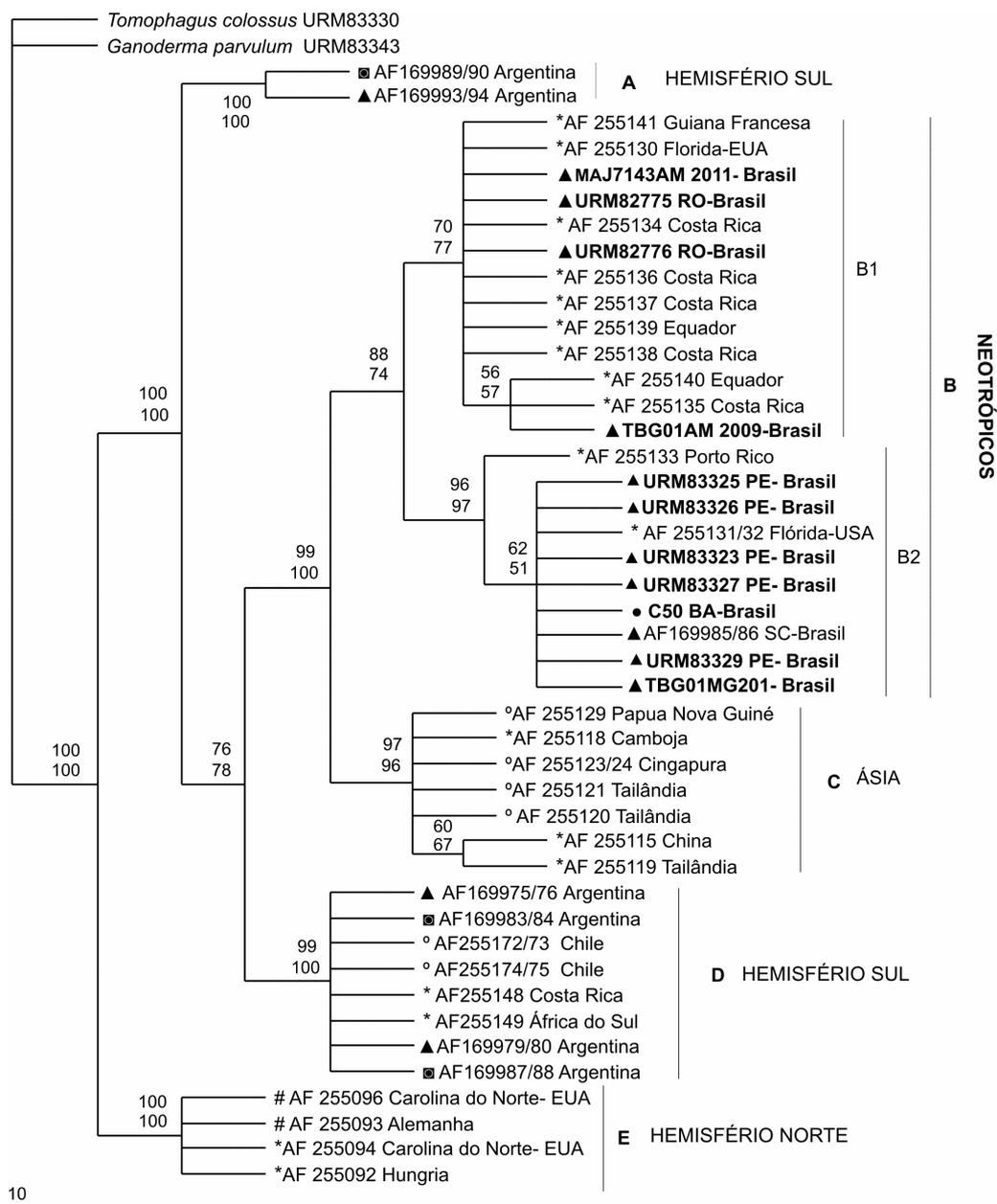


Fig. 12. Reconstrução filogenética do subg. *Elfvigia* obtida a partir do alinhamento em 398 sítios relativos às regiões ITS (ITS I + ITS II). Valores de *bootstrap* (em %) foram gerados a partir do método de máxima parcimônia e de método neighbor joining com as distâncias de Kimura 2-parâmetros (1000 *bootstraps*), respectivamente, e somente valores acima de 50% são apresentados. Um exemplar de *Ganoderma parvulum* (URM 83343) e um de *Tomophagus colossus* (URM 83330) foram utilizados como grupo externo. Índice de Consistência = 0.8509 e Índice de Retenção = 0.9676. # = *G. applanatum*; * = *G. applanatum* cplx; ● = *G. australe*; ° = *G. australe* cplx; ■ = *G. lobatum*; ▲ = *G. tornatum*.

No clado A, foram agrupados (MP 100% e NJ 100%) dois espécimes argentinos (um *G. lobatum* e um *G. tornatum*), enquanto o clado B foi formado basicamente por espécimes neotropicais (MP 88% e NJ 74%). No clado C, foram agrupados os representantes de origem asiática (Camboja, China, Cingapura, Papua Nova Guiné e Tailândia) com altos valores de *bootstrap* (MP 97% e NJ 96%). No clado D, foram agrupados (MP 99% e NJ

100%) quatro espécimes argentinos (dois *G. tornatum*, um *G. lobatum* e um representante mencionado apenas como pertencente ao complexo *G. australe*), dois táxons chilenos (um *G. australe* cplx e um *G. lobatum*), além de dois outros representantes do complexo *G. applanatum*, sendo um originário da Costa Rica e outro da África do Sul. E no clado E, foram alocados dois representantes europeus e os dois da América do Norte (MP 99% e NJ 100%).

De modo geral, observa-se uma forte correlação entre os agrupamentos formados e a distribuição geográfica dos espécimes em análise. Foi observada a formação de agrupamentos distintos entre os exemplares neotropicais (B) e os demais espécimes do subgênero provenientes do Hemisfério Sul (Clado A e D), de países asiáticos (C) e de áreas temperadas (E). A exceção foi a presença de um espécime da Costa Rica alocado no clado D. No entanto, este foi coletado em áreas com condições de temperatura semelhantes aos demais componentes do clado, 2.700m de altitude, conforme mencionado por Moncalvo e Buchanan (2008), sendo uma evidência de que fatores climáticos podem ser importantes para a distribuição geográfica de *Elfvíngia*, fato este já mencionado por vários autores (Chang *et al.*, 1996; Gottlieb & Wright, 1999; Kaliyaperumal & Kalaichelvan, 2008).

O clado B, composto por representantes neotropicais, divide-se em dois subclados próximos: B1 e B2, o que demonstra uma divergência recente para os neotrópicos. Na primeira subdivisão (B1), quatro exemplares brasileiros (dois do Amazonas e dois de Rondônia), além dos representantes da Costa Rica, Equador, Estados Unidos (Flórida) e Guiana Francesa foram agrupados, sendo todos de áreas tropicais ou subtropicais. Já em B2, alocaram-se os espécimes provenientes de áreas de Mata Atlântica (Bahia, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco e Santa Catarina), além de um exemplar dos Estados Unidos (Flórida) e um de Porto Rico.

Moncalvo & Buchanan (2008), ao estudar a distribuição do complexo *G. applanatum-australe* num contexto global, mencionaram que ainda deva existir fluxo gênico entre espécimes de diferentes áreas neotropicais. De certo modo, a presença de um exemplar da Flórida (EUA) em cada um dos subclados formados, assim como a presença de um exemplar de Porto Rico no suclado B2 podem sugerir a existência desse fluxo gênico, mesmo que restrita a determinadas áreas dos neotrópicos. Moncalvo & Buchanan (2008) especularam ainda que os principais eventos de diversificação do grupo devam ter ocorrido há mais de 30 milhões de anos atrás a partir do Sudeste da Ásia, incluindo a radiação para regiões temperadas, bem como para os neotrópicos.

O fato de exemplares de *G. tornatum* do Nordeste, Sul e Sudeste do Brasil estarem agrupados com exemplares de Porto Rico e dos Estados Unidos (Flórida), podem, alternativamente, ser atribuídos a eventos de dispersão episódicos. Estes tipos de eventos, pobremente conhecidos para fungos, atribuem-se, geralmente, às atividades humanas ou até às massas de ar, pois diferentemente de animais, os fungos têm como forma de dispersão os esporos que podem ser transportados por longas distâncias (Moncalvo & Buchanan, 2008).

Todos os espécimes brasileiros de *G. australe* e *G. tornatum* alocaram-se no clado B, porém distribuídos nas subdivisões B1 e B2 de acordo com a localização geográfica (Mata Atlântica e Floresta Amazônica). Esta diferenciação também é observada a partir da análise da árvore filogenética relativas às sequências das regiões LSU (Fig.5 - R.2). Esta subdivisão pode indicar um fluxo gênico restrito a partir de isolamento por distância entre essas duas florestas, embora seja difícil estimar esse tipo de evento para fungos (Buchanan, 2001). No passado, a Mata Atlântica e a Floresta Amazônica foram conectadas através do nordeste ou de corredores de florestas nas bacias Amazônica, do Rio São Francisco e do Rio Paraná (Bigarella *et al.*, 1975). Costa (2011) também comenta que a região central do Brasil teria grande influencia na ligação entre estas florestas.

Do ponto de vista taxonômico, estabelecer conceitos de espécie e atribuir nomes são os maiores desafios que cercam o sugênero *Elfvíngia*. Essa dificuldade pode ser exemplificada pela presença de pelo menos um espécime identificado como *G. tornatum* (Fig. 7) nos cladogramas A, B e D, e pelo fato de todas as sequências obtidas a partir de espécimes neotropicais de *Elfvíngia* que se encontram depositadas no GenBank, foram depositadas como sendo de exemplares de *Ganoderma* sp. Moncalvo & Buchanan (2008) mencionaram esses espécimes como sendo simplesmente do complexo *G. applanatum-australe*, porém sem nenhuma definição taxonômica ao nível específico.

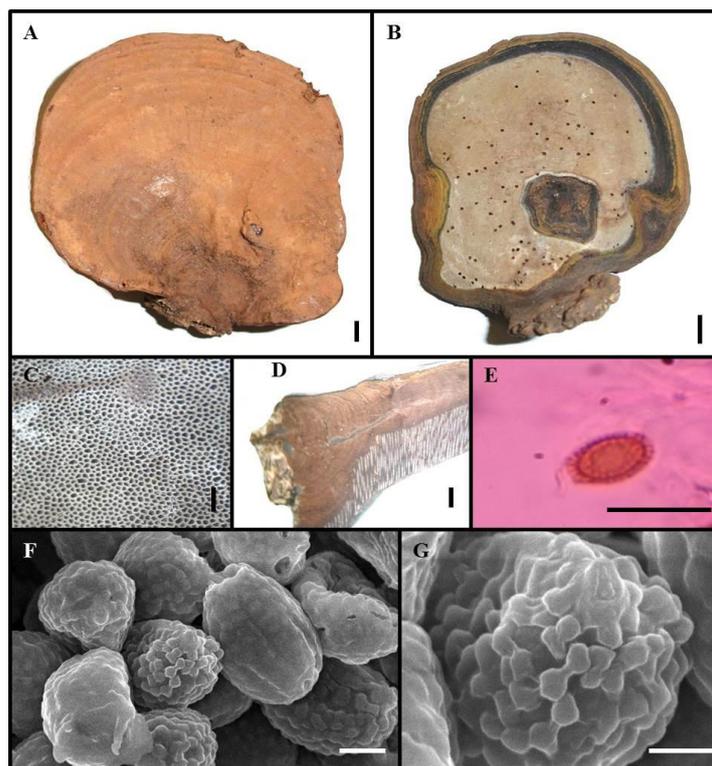


Fig. 13. *Ganoderma tornatum* (URM 83326). **A-B**. Basidioma. **C**. Superfície himenial. **D**. Presença de linha no contexto. **E-F**. Basidiosporos. **G**. Ornamentação dos basidiosporos. Escala: A-B-C = 1cm; E= 10 μ m; F= 2 μ m; G = 1 μ m.

De todo modo, Ryvarden (2004) considera *G. applanatum* como restrito a zonas temperadas, enquanto *G. australe* possui distribuição pantropical e comum a áreas tropicais e subtropicais. Embora concordemos com Ryvarden (2004), aceitamos o nome *G. tornatum* (Pers.) 1912 (\equiv *Polyporus tornatus* Pers. 1827) temporariamente em substituição a *G. australe* (Fr.) Pat. 1889 (\equiv *Polyporus australis* Fr. 1828) conforme primeiramente mencionado por Humphrey & Leus (1932) e posteriormente defendido por Steyaert (1975) e Gottlieb *et al.* (1999b). Segundo estes, o nome *G. australe* é confuso por carecer de descrições modernas, além de seu espécime-tipo, coletado em uma ilha do Pacífico, ter sido perdido. Entretanto, o espécime-tipo de *G. tornatum* é proveniente das Ilhas Marianas, no Pacífico, e desse modo, poderia ser mais bem aplicado a espécimes de origem asiática (clado C). Outra sugestão de nome para espécimes dessas regiões poderia ser *G. gibbosum* (Blume & T. Nees) Pat. 1897 (\equiv *Polyporus gibbosus* Blume & T. Nees 1826), nome mais antigo para a área, cujo espécime-tipo foi coletado em Java. Embora o espécime-tipo tenha sido perdido, existem ilustrações.

Já a espécime tipo de *G. applanatum* (Pers.) Pat. 1889 (\equiv *Boletus applanatus* Pers. 1799) é de origem européia, e desse modo pode ser mais bem aplicado a espécimes do continente europeu e da América do Norte (clado E). Entretanto, *G. applanatum* é considerado sinônimo para *G. lipsiense* (Batsch) G.F. Atk. 1908 (\equiv *Boletus lipsiensis* Batsch 1786) (<http://www.cbs.knaw.nl/databases/aphyllo/database.aspx>; <http://www.mycobank.org/mycotaxo.aspx>), cujo espécime-tipo foi coletado na Alemanha em 1786 (\equiv *Boletus lipsiensis* Batsch 1786). *Ganoderma lipsiense* é frequentemente utilizado para espécimes não lacados dessas áreas, embora seu espécime-tipo não exista mais.

A separação entre *G. applanatum* e *G. tornatum* (= *G. australe*) por morfologia tem se mostrado difícil, o que acarreta identificações equivocadas entre essas duas espécies que, por vezes, são mencionadas simplesmente como pertencentes a estes complexos. Ainda segundo Ryvarden (2004), *G. australe* possui basidioma similar a *G. applanatum*, mas diferencia-se por possuir incrustações ou linhas negras no contexto, além de possuir basidiosporos maiores (7 a 12 μ m). No entanto, em exemplares jovens de *G. australe*, a observação dessas linhas ou incrustações nem sempre é possível (Furtado, 1965a), o que pode levar a classificações incorretas. Torres-Torres *et al.* (2011) utilizando dos mesmos caracteres distintivos aceitam ambas as espécies para o Brasil.

Yeh & Chen (1990) e Chen (1991) diferenciaram dois grupos incompatíveis (inter-estéreis) de “*G. australe*” em Taiwan, separados por localização, altitude e condições de temperatura. Um desses grupos apresentou-se compatíveis com *G. lipsiense* da Índia e *G. australe* da Flórida (EUA), mas não com isolados de *G. lipsiense* de origem européia (Yeh *et al.*, 2000; Kaliyaperumal & Kalaichelvan 2008). Estes resultados são evidências de que nomes são frequentemente confundidos para o subgênero, além de confirmarem a separação de espécies de acordo com a distribuição geográfica.

A formação dos clados de acordo com a distribuição geográfica para o subgênero deixa claro que os conceitos e sinônimos para *G. applanatum* e *G. tornatum* (= *G. australe*) ainda precisam ser reavaliados e discutidos. Os exemplares neotropicais (clado B), por exemplo, podem não ser *G. applanatum* nem *G. tornatum*. O mesmo raciocínio é válido para espécimes argentinos, chilenos e sul-africanos (clados A e D). Para o clado A, nenhuma sugestão de alteração encontra-se disponível; para o clado D, *G. chilense* (Fr.) Pat. 1889 (\equiv *P. chilensis* Fr. 1851) é provavelmente o nome mais antigo disponível para espécimes da América do Sul (Chile) (Moncalvo & Ryvarden, 1997). Embora se afirme

que seu espécime-tipo foi depositado em Uppsala (<http://www.cbs.knaw.nl/>; <http://www.mycobank.org>), essa informação não é confirmada pelo banco de dados UPS (<http://130.238.83.220/botanik/home.php?-link=Home>).

Embora no clado B exemplares preliminarmente identificados como *G. tornatum* tenham se dividido de acordo com a localização geográfica (Floresta Amazônica e Mata Atlântica), somente um nome pode ser proposto para todos esses espécimes neotropicais em substituição a *G. tornatum*: *G. lobatoideum* Steyaert 1980, descrito com base em um espécime da Guiana Francesa. Porém, uma análise do espécime-tipo ainda se faz necessária para esta conclusão. Nenhuma diferenciação morfológica foi observada entre espécimes desses dois agrupamentos, sendo essa diferenciação detectável apenas pelas reconstruções filogenéticas. Postnova & Skolotneva (2010) já afirmaram que a evolução genética de muitas espécies fúngicas, resultantes de isolamentos reprodutivos (inter-estéreis), não é necessariamente acompanhada por alguma variação morfológica.

Este estudo é a primeira abordagem filogeográfica de um complexo de espécie do filo Basidiomycota para o Brasil, e pode servir como base para estudos posteriores com utilização de exemplares de outros biomas brasileiros.

No presente trabalho, evidencia-se que informações moleculares podem ser de grande ajuda no delineamento de táxons morfológicamente semelhantes, o que é fundamental para qualquer investigação científica. Nessa perspectiva, seria importante que as regiões do rDNA fossem utilizadas adicionalmente aos métodos tradicionais (taxonomia clássica) para uma identificação mais confiável de espécies em *Ganoderma*.

5. CONCLUSÕES

- É possível a obtenção de DNA genômico de *Ganoderma* a partir de exemplares herborizados, embora a extração resulte em produtos de menor qualidade em relação aos obtidos de amostras frescas;
- As regiões ITS e LSU do DNA ribossomal podem ser utilizadas, combinadas ou não, no estudo taxonômico de espécies de *Ganoderma* de origem brasileira;
- Espécimes brasileiros de *Ganoderma* formam um grupo monofilético;
- Baseando-se exclusivamente em exemplares de origem brasileira pode-se observar o monofiletismo para o sugênero *Elfvíngia*, mas não para o subgênero *Ganoderma*;
- Observou-se que a presença ou ausência de linhas ou depósitos resináceos no contexto são relevantes caracteres taxonômicos para espécies de *Ganoderma*;
- A distribuição geográfica é um valioso dado na delimitação de espécies do gênero;
- A busca para um novo nome para “*G. resinaceum*” e “*G. tornatum*” de origem brasileira se faz necessária, a fim de solucionar a confusão taxonômica que envolve essa nomenclatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adaskaveg, J.E.; Gilbertson, R.L. 1986. Cultural studies and genetics of sexuality of *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae* in relation to the taxonomy of the *G. lucidum* complex. *Mycologia* 78: 694-705.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. New York, John Wiley and Sons, Inc., Nova York.
- Ames, A. 1913. A consideration of structure in relation to genera of Polyporaceae. *Ann. Mycol.* 11:211-253.
- Anderson, D. L.; Gibbs, A. J.; Gibson, N. L. 1998. Identification and phylogeny of spore-cyst fungi (*Ascosphaera* spp.) using ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 102: 541-547.
- Atkinson, G. F. 1908. On the identity of *Polyporus applanatus* of Europe and North America. *Annales Mycologici* 6: 179-191.
- Avise, J.C.; Arnold, J.; Ball, R.M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A.; Sauders, N.C. 1987. Intra-specific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489 - 522.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, Inc.; USA. 511p.
- Avise, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371 – 379.
- Bazzalo, M. E. & Wright, J. E. 1982. Survey of the Argentine species of the *Ganoderma lucidum* complex. *Mycotaxon* 16: 295-325.
- Begerow, B; Nilsson, H; Unterseher, M; Maier, W. 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl Microbiol Biotechnol* (2010) 87:99–108.
- Binder, M.; Hibbett, D.S. 2002. Higher-Level Phylogenetic Relationships of Homobasidiomycetes (Mushroom-Forming Fungi) Inferred from Four rDNA Regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22(1): 76–90.
- Binder M, Hibbett D, 2007 [2006]. Molecular systematics and biological diversification of Boletales. *Mycologia* 98: 971–981.
- Blackwell M.; Hibbett, D.S.; Taylor, J.W.; Stapaphora, J.W. 2006. Research Cooredination Networks: a phylogeny for kingdom *Fungi* (Deep Hypha). *Mycologia* 98: 829-837.
- Blackwell, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98(3): 426–438.
- Boudier, E; Fischer, E. 1894. Rapport sur les espèces de Champignons trouvées pendant l'assemblée a Geneve et les excursions faites en Valais. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 11, 27-30.
- Boudier, E. 1895. Description de quelques noivelles espèces de Champignons recoltées dans lês regions elevées de Alpes Du Valais, em aout 1984. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 41, 237-249.
- Bruns, T. D.; Fogel, R.; Taylor, J. W. 1990. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. *Mycologia* 82: 175-184.
- Bruns, T.D.; Arnold, A.E; Hughes, K.W. 2008. Fungal networks made of humans: UNITE, FESIN, and frontiers in fungal ecology. *New Phyt.* 177: 586–8.
- Buchanan, P.K. 2001. A Taxonomic overview of the Genus *Ganoderma* with Special Reference to Species of Medicinal and Nutriceutical Importance. Proc Int Symposium *Ganoderma* Sci, Auckland.

- Caixeta, E.T.; Oliveira, A.C.B.; Brito, G.G.; Sakiyama, N.S. 2006. Tipos de Marcadores Moleculares. *In: Marcadores Moleculares* (Borém, A. and Caixeta, E.T., eds.). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: 9-78.
- Carlile, M.J.; Watkinson, S.C. 1994. *The Fungi*. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom, pp.588.
- Chen, Z.C. 1991. On speciation in the genus *Ganoderma*. *In: Nishimura K. Ascomycetes and Basidiomycetes Studies Now. International Minisymposium of the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses*, Chiba University, pp 9.
- Chen, C.S. 1993. Methods for inducing various morphological fruiting body of *Ganoderma tsugae* Murr. *Trans. Mycol. Soc. R. O. C.* 8: 9-16.
- Chen, Y.C.; Eisner, J.D.; Kattar, M.M.; Rassouljian-Barret, S.L.; Lafe, K.; Bui, U.; Limaye, A.P.; Cookson, B.T. 2001. Polymorphic internal transcribes spacer region 1 DNA sequences odontitofy medically important yeasts. *Journal of clinical microbiology*. 39: 4042-4051.
- Chang, C.Y; Yeh, Z.Y; Chen, G.J.C. 1996. Analysis of Genetic Diversity of two intersterility groups of *Ganoderma australe* by DNA sequencing. *Biol. Bull* 31(1): 47-53.
- Chillali, M.; Idder-Ighili, H.; Guillaumin, J. J.; Mohammed, C.; Escarmant, B. L.; Botton, B. 1998. Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the biological species of European *Armillaria*. *Mycological Research* 102: 533-540.
- Cooke, D. L. & Duncan, J. M. 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS 1 and ITS 2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycological Research* 101: 667-677.
- Corner, E. J. H. 1983. Ad Polyporaceas I: *Amauroderma* and *Ganoderma*. *Beihefte zur Nova Hedwigia* 75: 1-182.
- Crawford, A. R.; Bassam, B. J.; Drenth, A.; Maclean, D. J.; Irwin, J. A. G. 1996. Evolutionary relationships among *Phytophthora* species deduced from rDNA sequence analysis. *Mycological Research* 100: 437-443.
- Dai, Y.C.; Cui, B.K.; Decok, C. 2008. A new species of *Formitiporia* (Hymenochaetaceae, Basidiomycota) from China based on morphological and molecular characters. *Mycological Research* 112:375-380.
- Donk, M.A. 1964. A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia* 3: 199-324.
- El-Dine, R.S.; El-Halawany, A.M.; Ma, C.M.; Hattori, M. 2009. Inhibition of the Dimerization and Active Site of HIV-1 Protease by Secondary Metabolites from the Vietnamese Mushroom *Ganoderma colossum*. *Journal of Natural Products* 72: 2019–2023.
- 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.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP e análise genética*. EMBRAPA/CENARGEN, Brasília, pp.220.
- 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.*
- Fries, E. 1828. *Elenchus Fungorum*. Vol. 1, pp 238 .

- Fungaro, M.H.P. *PCR na Micologia*. 2000. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento 14: 12-16.
- Furtado, J.S. 1965a. Relation of microstructures to the taxonomy of the Ganodermoideae (Polyporaceae) with special reference to the structure of the cover of the pilear surface. *Mycologia*, vol. LVII, nº4, p 588-611.
- Furtado J.S. 1965b. *Ganoderma colossum* and the status of *Tomophagus*. *Mycologia* 57:979-984.
- Furtado, J. S. 1967. Some tropical species of *Ganoderma* (Polyporaceae) with pale context. *Persoonia* 4, 379-389.
- Garnicaa, S.; Weissa, M.; Waltherb, G.; Oberwinkler, F. 2007. Reconstructing the evolution of agarics from nuclear gene sequences and basidiospore ultrastructure. *Mycological Research* 111: 1019-1029.
- 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.
- 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 RT. 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.
- Gottlieb, A. M.; Saidman, B. O.; Wright, J. E. 1998. Isoenzymes of *Ganoderma* species from southern South America. *Mycological Research* 102, 415-426.
- Gottlieb A.M. & Wright J.E. 1999a. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. *Mycological Research* 104: 661-673.
- Gottlieb A.M. & Wright, J.E. 1999b. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Elfvigia*. *Mycological Research* 103:1289-1298.
- Gottlieb, A.M.; Ferrer, E.; Wright, J.E. 2000. rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma*. *Mycological Research* 104:661-673.
- Graur, B.; Li, W.H. 2000. *Molecular Phylogenetics*. In: D. Graur & W.H. Li (Eds.). *Fundamentals of Molecular Evolution*, pp 165-247.
- Gugliotta, A.M.; Silveira, R.M.B.; Loguercio-Leite, C.; Campos-Santana, M.; Gibertoni, T.B.; Drechsler-Santos, E.R.; Gomes-Silva, A.C.; Baltazar, J.M. 2010. Polyporales in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB092411>).
- Haddow, W.R. 1931. Studies in *Ganoderma*. *Jour. Arnold Arb.* 12: 25-46.
- 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.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98
- Halling, R.E.; Osmundson, T.W; Neves, M.A. 2008. Pacific boletes: Implications for biogeographic relationships. *Mycological Research* 112: 437 - 447.
- 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. 1992. Ribossomal. RNA and fungal systematics. *Transactions of Mycological Society of Japan* 33: 533-556.
- Hibbett, D. S.; Donoghue, M. J. 1995. Progress towards a phylogenetic classification of the Polyporaceae through parsimony analysis of mitochondrial ribosomal sequences. *Canadian Journal of Botany* 73 (1): 853±861
- Hibbett D.S. *et al.* 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: 38- 47.
- Hong, S.G.; Jung, H.S. 2004. Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 96(4): 742–755.
- Hopple, J.S.; Vilgalys, R. 1999. Phylogenetic Relationships in the Mushroom Genus *Coprinus* and Dark-Spored Allies Based on Sequence Data from the Nuclear Gene Coding for the Large Ribosomal Subunit RNA: Divergent Domains, Outgroups, and Monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13 (1): 1–19.
- Hseu R.S.; Wang, H.H; Wang, H.F.; Moncalvo, J.M. 1996. Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1354-1363.
- Imazeki, R. 1943. Genera of Polyporaceae of Nippon. *Bull. Tokyo Sci. Mus.* 6:I-III, tt. I-III.
- James T.Y. *et al.* 2006. Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature* 443: 818–822.
- Jeong, W.J.; Lim, Y. W.; Lee, J.S.; Jung, H.S. 2005. Phylogeny of *Phellinus* and related genera inferred from combined data of ITS and Mitochondrial SSU rDNA sequences. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15(5): 1028-1038.
- Kaliyaperumal, M. & Kalaichelvan, P.T. 2008. *Ganoderma australe* from southern India. *Microbiological Research* 163: 286-292.
- Karsten, P. A. 1881. Enumeratio boletinearum et polyporarum fennicarum. Systemate novo dispositorum. *Revue de Mycologie* 3: 16-19.
- Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; Minter, D.W.; Stalpers, J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10^o Ed, CAB International.
- Larkin, M.A. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Larsson, E.; Larsson, K.H. 2003. Phylogenetic relationships of russuloid basidiomycetes with emphasis on aphylllophoralean taxa. *Mycologia* 95(6): 1037–1065.
- 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.
- Leonard, A.C. 1998. Two *Ganoderma* species compared. *Mycologist* 12: 65-68.
- Lindequist, U., T.H. Niedermeyer and W.D. Julich. 2005 The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM.* 2: 285-299.
- Loguercio-Leite, C.; Groposo, C.; Halmenschlager, M.A. 2005. Species of *Ganoderma* Karsten in a subtropical area (Santa Catarina State, Southern Brazil). *Iheringia, Sér. Bot.*, 60: 135-139.
- Martinez, A.T.; Barrasa, J.M.; Prieto, A.; Blanco, M.N. 1991. Fatty acid composition and taxonomic status of *Ganoderma australe* from Southern Chile. *Mycological Research* 95: 782-784.

- Mau, J.; Lin, H.; Chen, C. 2001. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Res Int.* 34: 521–526.
- Moncalvo, J.M.; Wang, H.H; Hseu, R.S. 1995a. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87: 223-258.
- Moncalvo, J.M.; Wang, H.H; Hseu, R.S. 1995b. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 99: 1489-1499.
- Moncalvo, J.M.; Wang, H.F.; Wang, H.H.; Hseu, R.S. 1995c. The use of ribosomal DNA sequence data for species identification and phylogeny in the Ganodermataceae. In: Buchanan PK, Hseu RS and Moncalvo JM ed. *Ganoderma*, systematics, phytopathology and pharmacology. Proceedings of Contributed Symposium 59 A,B, 5th International Mycological Congress, Vancouver, August 14-21, 1994. Taipei. Pp. 31-44.
- Moncalvo, J. M.; Ryvarden, L. 1997. *A nomenclatural study of the Ganodermataceae* Donk. Fungiflora, Oslo 11: 1-114.
- Moncalvo, J. M.; Lutzoni, F. M.; Rehner, S. A.; Johnson, J.; Vilgalys, R. 2000. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* 49: 278-305.
- Moncalvo, JM; Buchanan, PK. 2008. Molecular evidence for long distance dispersal across the Southern Hemisphere in the *Ganoderma applanatum-australe* species complex (Basidiomycota). *Mycological Research* 425-436.
- Moore, D.; Frazer, L.A.N. 2002. *Essential Fungal Genetics*. New York: Springer.
- Mueller, G.M.; Bills, G.F. 2004. Introduction. In: Mueller, G.M., Bills, G.F., Foster, M.S. (eds.) *Biodiversity of Fungi – Inventory and monitoring methods*. Amsterdam: Elsevier, Academic Press 159-163.
- Murrill, W. A. 1902. The Polyporaceae of North America I. The genus *Ganoderma*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 29, 599-608.
- Murrill, W. A. 1903. The Polyporaceae of North America. IV. The genus *Elfvigia*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 30: 296-301.
- Murrill, W.A. 1905a. The Polyporaceae of North America: XII. A synopsis of the white and bright-colored pileate species. *Bull Torrey Bot Club* 32: 469–493.
- Murrill, W.A. 1905b. *Tomophagus* for *Dendrophagus*. *Torreya* 5:197.
- Murrill, W. A. 1908. *North American Flora* 9 (2), 113-124.
- Nilsson, R.H.; Kristiansson, E.; Ryberg, M.; Hallenberg, N.; Larsson, K.H. 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, 2008.
- Overholts, L. O. 1953. *The Polyporaceae of the United States, Alaska and Canada*. University of Michigan Press: Ann Arbor.
- Patouillard, N. 1889. Le genre *Ganoderma*. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 5, 64-80.
- Pegler D.N.; Young, T.W.K. 1973. Basidiospore form in the British species of *Ganoderma* Karst. *Kew Bull* 28: 351–370.
- Posada, D., Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Postnova, E.L. & Skolotneva, E.S. 2010. *Ganoderma lucidum* Complex: Some Individual Groups of Strains. *Microbiology*. Vol. 79 N. 2.

- 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.
- Rosenberg, M.S.; Kumar, S. 2001. Incomplete taxon sampling is not a problem for phylogenetic inference. *Evolution* 98(19): 10751-10756.
- Rouland-Lefevre, C.; Diouf, M.N.; Braunan, A.; Neyra, M. 2002. Phylogenetic relationships in *Termitomyces* (Family *Agaricaceae*) based on the nucleotide sequence of ITS: A first approach to elucidate the evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing termites and their fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22(3): 423-429.
- Ryvarden, L. 1991. Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. *Synopsis Fungorum* 5: 1-363.
- Ryvarden, L. 1995. Can we trust morphology in *Ganoderma*? In: Buchanan PK, Hseu RS and Moncalvo JM ed. *Ganoderma*, systematics, phytopathology and pharmacology. Proceedings of Contributed Symposium 59 A,B, 5th International Mycological Congress, Vancouver, August 14-21, 1994. Taipei pp 19-24.
- Ryvarden, L. 2000. Studies in neotropical polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia* 92: 180-191.
- Ryvarden, L. 2004. *Neotropical Polypores*. Part 1. *Synopsis Fungorum* 19, Fungiflora, Oslo.
- 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.; Samson R.A.; Dewaard, J.R.; Houbraken, J.; Levesque, C.A.; Moncalvo, J.M.; Louis-Seize, G.; Hebert, P.D.N. 2007. Prospects for fungus identification using COI DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 3901–3906.
- Seifert, K.A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 1: 83-89.
- Seo, G.S.; Kirk, P.M. 2000. *Ganodermataceae: Nomenclature and classification*, In: *Ganoderma Disease of Perennial Crop*, Flood, J; Bridge, PD; Holderness, P (Eds.). CABI Publishing, Wallingford, UK., ISBN: 0851993885, 3-22.
- Sheldon, F.H.; Bledsoe, A.H. 1993. Avian molecular systematic, 1970s to 1990s. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 243-278.
- Singer, G.A.C.; Hajibabaei, M. 2009. Barcode.org: web-based molecular biodiversity analysis. *BMC Bioinformatics* 10(Suppl 6):S14.
- Smith, B.J. & Sivasithamparam, K. 2000. Isozymes of *Ganoderma* species from Australia. *Mycol. Res.* 104 (8): 952-961.
- Smania, E.F.A; Monache, F.D.; Yunes, R.A.; Paulert, R.; Smania-Junior, A. 2007. Antimicrobial activity of methyl australate from *Ganoderma australe*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17(1): 14-16.
- Stamets, P.; Yao, C.D.W. 1999. Mycomedicinals7, and information booklet on medicinal mushrooms. *MycMedia*, Olympia, WA, USA. pp 45.

- Steyaert, R. L. 1972. Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bogor and Leiden herbaria. *Persoonia* 7: 55-118.
- Steyaert, R. L. 1975. The concept and circumscription of *Ganoderma tornatum*. *Transactions of the British Mycological Society* 65: 451-467.
- Steyaert, R. L. 1980. Study of some *Ganoderma* species. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* 50: 135-186.
- Steyaert, R. L. 1980. Study of some *Ganoderma* species. *Bulletin Jardin Botanique Nationale de Belgique* 50: 135-186.
- Systemsma, K.; Givnish, T.J.; Smith, J.F.; & Hahn, W.J. 1993. Collection and storage of land plant samples for macromolecular comparisons. *In* *Methods in Enzymology - Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data* (E.A. Zimmer, T.J. White, R.L. Cann & A.C. Wilson, eds.). Academic Press, San Diego. v.24, p.23-38.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland MA.
- 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, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S. et al. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 31: 21-32.
- Teixeira, A.R. 1995. Método para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos. Manual nº 6, *Instituto de Botânica*, São Paulo.
- Tham, L.X.; Hung, N.L.Q.H.; Duong, P.N.D.; Hop, D.V.; Dentinger, B T. M; Moncalvo, J.M. 2011. *Tomophagus cattienensis* sp. nov., a new Ganodermataceae species from Vietnam: Evidence from morphology and ITS DNA barcodes. *Mycol Progress*.
- Torrend, C. 1920. Les polyporacées du Brésil I. Le genre *Ganoderma*. *Brotéria, Ser. Bot.*, 18: 23-43.
- Torres-Torres, M.G.; Guzmán-Dávalos, L.; Gugliotta, A.M. 2011. *Ganoderma* (*Basidiomycota*) in Brazil: known species and new occurrences. *Mycotaxon*: (no prelo).
- Tseng, Y.H.; Yang, J.H.; Mauc, J.L. 2008. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* 107: 732-738.
- Ueng, P. P., Subramaniam, K., Chen, W., Arseniuk, E., Wang, L., Cheung, A. M., Hoffmann, G. M. & Bergstrom, G. C. 1998. Intraspecific genetic variation of *Stagonospora avenae* and its differentiation from *S. nodorum*. *Mycological Research* 102: 607-614.
- Vilgalys, R.; Sun, B. L. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 4599-4603.
- Wagner, T. & Fischer, M. 2001. Natural groups and a revised system for the European poroid *Hymenochaetales* (*Basidiomycota*) supported by nLSU rDNA sequence data. *Mycol. Res.* 105 (7): 773-782
- Wagner, T. & Fischer, M. 2002. Proceedings towards a natural classification of the worldwide taxa *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l., and phylogenetic relationships of allied genera. *Mycologia* 94: 998-1016.
- Wang, G.J.; Huang, Y.J.; Chen, D.H.; Lin, Y.L. 2009a. *Ganoderma lucidum* Extract Attenuates the Proliferation of Hepatic Stellate Cells by Blocking the PDGF Receptor. *Phytother. Res.* 23: 833-839.
- Wang, D.M.; Wu, S.H.; Su, C.H.; Peng, J.T.; Shih, Y.H.; Chen, L.C. 2009b. *Ganoderma multipileum*, the correct name for '*G. lucidum*' in tropical Asia. *Botanical Studies* 50: 451-458.

- 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, DH; Sninsky, JJ; White, TJ. PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York, 315-322.
- Yeh, Z.Y.; Chen, Z.C. 1990. Preliminary investigations of *Ganoderma australe* (subgen. *Elfvigia*) in Taiwan. *Taiwania* 35: 127-141.
- Yeh, Z.Y.; Chen, Z.C.; Kimbrough, J.W. 2000. *Ganoderma australe* from Florida. *Mycotaxon* 75: 233-240.
- Yoshimura, K.; Kamoto, T.; Ogawa, O.; Matsui, S.; Tsuchiya, N.; Tada, H.; Murata, K.; Yoshimura, K.; Habuchi, T.; Fukushima, M. 2010. Medical mushrooms used for biochemical failure after radical treatment for prostate cancer: An open-label study. *International Journal of Urology* 17, 548–554.
- Zakaria, L.; Ali, N.S.; Salleh, B.; Zakaria, M. 2009. Molecular analysis of *Ganoderma* species from different hosts in Peninsula Malaysia. *Journal of biological Sciences* 9(1):12-20.
- Zhao, J.D. 1989. *The Ganodermataceae in China*. Bibliotheca Mycologica 132: 1-176.
- Zheng, L.; Jia, D.; Fei, X.; Luo, X.; Yang, Z. 2009. An assessment of the genetic diversity within *Ganoderma* strains with AFLP and ITS PCR-RFLP. *Microbiological Research* 164: 312-321.
- Zhou, X.; Lin, J.; Yin, Y.; Zhao, J.; Sun, X.; Tang, K. 2007. Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. *American J Chin Med.* 35: 559-574.