



***CYATHUS* (BASIDIOMYCOTA): RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE ESPÉCIES DO  
NORDESTE BRASILEIRO**

**MARIA APARECIDA DA SILVA**

**RECIFE  
2012**



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

***Cyathus* (Basidiomycota): relações filogenéticas de espécies do Nordeste Brasileiro**

**MARIA APARECIDA DA SILVA**

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 Básica

**Orientador:** Dra. Elaine Malosso

**Co-orientador:** Dr. Iuri Goulart  
Baseia

**RECIFE**  
**2012**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Silva, Maria Aparecida**

**Cyathus (Basidiomycota): relações filogenéticas de espécies do Nordeste brasileiro  
/– Recife: O Autor, 2012.**

**70folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Elaine Malosso**

**Coorientador: Iuri Goulart Baseia**

**Dissertação(mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro  
de Ciências Biológicas, Biologia de Fungos, 2014.**

**Inclui bibliografia e apêndice**

1. BasidiomycetesI. Malosso, Elaine (orientadora) II.Baseia, Iuri  
Goulart(coorientador) III. Título

**579.59  
021**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2014-**

***CYATHUS* (BASIDIOMYCOTA): RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE ESPÉCIES DO  
NORDESTE BRASILEIRO**

**MARIA APARECIDA DA SILVA**

Data da defesa: 15/03/2012

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

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

---

Dr. Gladstone Alves da Silva  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Vagner Gularte Cortez  
Universidade Federal do Paraná (Campus Palotina)

“Caminhante não há caminho,  
O caminho faz-se ao andar”.

Antônio Machado

## **Agradecimentos**

Ao me pai Inácio Gomes da Silva pelo exemplo de honestidade e por me ensinar que tudo se consegue sem esforço não vale a pena. A minha mãe Elvira Wagna da Silva, por ser minha companheira e conselheira de todos os momentos.

Aos meus irmãos, Pedro Tiago Gomes da Silva e Camila Monaliza da Silva, pelo apoio e compreensão que tiveram nos meus momentos de insanidade.

A meu noivo, Marcos Mateus Barros Barbosa, por nunca me deixar desistir mesmo nos momentos em que nem ninguém, inclusive Eu, acreditava que podia. Obrigada Amor por tudo.

A Prof<sup>a</sup> Elaine Malosso, por tudo, pela paciência, pelos conselhos, pela oportunidade de desenvolver nosso projeto, por “quase sempre” estar lá para ajudar, enfim por aceitar ser minha orientadora, e por muitas vezes mais que isso. Obrigada.

Ao Prof. Iuri Goulart Baseia pela oportunidade de pesquisa na área e por toda valiosa orientação fornecida.

Aos professores Vagner Gularte Cortez e Gladstone Alves da Silva por integrar a banca examinadora e contribuir com valiosas críticas e sugestões.

A Prof<sup>a</sup>. Laise de Holanda Cavalcanti e ao Felipe Wartchow por integrarem a suplência da banca examinadora contribuindo com valiosas críticas e sugestões.

A Prof<sup>a</sup>. Leonor Costa Maia pelas críticas e sugestões na elaboração do projeto e desenvolvimento da dissertação bem como pelo fornecimento de exsicatas provenientes do herbário URM para estudos mais aprofundados .

A Prof<sup>a</sup>. Tatiana Gibertoni por sempre deixar o Laboratório de Taxonomia aberto para minhas pesquisas.

Ao Professor Paulo Marinho por ser o primeiro a me ensinar um pouco de Biologia Molecular.

Aos professores Maria Regina de Vasconcellos Barbosa e Luciano Queiroz curadores dos herbários JPB e HUEFS pelo fornecimento das exsicatas. E aqui também estendo meus agradecimentos ao professor José Luiz Bezerra e a Altielys Magnago que fizeram a ponte para que eu pudesse chegar a esses herbários.

Ao professor Luis Fernando Pascholati Gusmão, pelo financiamento de nossas sequências.

Aos meus estimados amigos Nelson Correia de Lima Júnior e Tiara Cabral, pela paciência que tiveram comigo durante todos esses meses, e pelos valiosos conselhos.

A Rhudson Cruz pelas belíssimas ilustrações que fazem parte deste trabalho e por ter me ajudado nas identificações. Principalmente pela amizade que perdurará por muito tempo, sempre amarrada pelo amor aos Cyathus.

Ao meu amigo Roger Melo que com seus preciosos conselhos muito me ajudou na construção deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório de biologia de fungos da UFRN, e do BIOMOL da UFPE que de uma forma ou de outra contribuíram para o término desta dissertação.

As Universidades Federais de Pernambuco e do Rio Grande do Norte por permitir a utilização de sua infraestrutura durante a execução desta dissertação.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos por financiar parte das minhas coletas.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo fornecimento da bolsa.

## RESUMO GERAL

O gênero *Cyathus* Haller: Pers., junto com mais quatro gêneros, formou, por muito tempo, um grupo conhecido como “Bird’s nest fungi” devido a morfologia cônica com estrutura lenticulares em seu interior, lembrando ovos em seus ninhos. Os estudos morfológicos, durante muito tempo, forneceram a base para as diferentes construções de classificação infragenérica e, como muitas espécies se diferenciavam de forma tênue, isso gerava muita polêmica. Sequências de DNA vêm sendo usadas para esclarecer melhor a história evolutiva do grupo. No Brasil, o grupo é pouquíssimo estudado, de forma que mais trabalhos envolvendo a união da taxonomia molecular com a tradicional são necessários para uma melhor compreensão do gênero. Assim, o presente trabalho teve como objetivos inferir a filogenia de espécimes de *Cyathus* oriundas do nordeste brasileiro e, com a associação dos caracteres morfológicos, propor uma classificação melhor para o táxon. Para isso, foram examinadas 46 exsicatas, das quais seis eram do herbário JPB, cinco do Herbário HUEFS e 37 do herbário de Fungos UFRN, sendo que este último apresenta o maior número de exsicatas de *Cyathus* no Nordeste, somando um total de 19 espécies. Dos 46 espécimes, 33 foram utilizados para extração de DNA, resultando no sequenciamento da região ITS de seis espécies e da região LSU de oito espécies. As árvores filogenéticas mostram que essas espécies se encontram em clados separados das demais espécies oriundas de regiões não tropicais, no entanto, não altera a topologia geral dos principais clados sugeridos em trabalhos anteriores. De acordo com os estudos taxonômicos tradicionais, temos duas espécies que constituem segundo registro para o mundo: *C. pedicelatus* e *C. setosus*; uma primeira referência para o Brasil de *C. olivaceobrunneus*, e a primeira referência para o Nordeste de *C. bekerleyanus*. A análise dos dados moleculares aponta para a delimitação de cinco novas espécies para a ciência. Todas as sequências de DNA geradas foram depositadas no GenBank e são novas para o banco de dados.

**Palavras-chave:** fungos gasteróides, filogenia, classificação, herbários, ITS rDNA, LSU rDNA.

## ABSTRACT

The genus *Cyathus* Haller: Pers., together with other four genera, formed a group known as bird's nest fungi due to their conic morphology with lenticular structures inside resembling bird's eggs in their nests. Morphological studies, for a long time, provided the basis to the different constructions of infrageneric classification and, as many species differed weakly from one another, that generated much controversy. DNA sequences have been used to better clarify the evolutionary history of the group. In Brazil, the group is as yet poorly studied, hence, more work involving the union of the traditional and molecular taxonomy is needed for better understanding of the genus. Therefore, this work had the objectives of inferring the phylogeny of specimens of *Cyathus* from the Brazilian Northeast and, in association with morphological characters, to propose a better classification for the taxon. Forty six exsiccates were examined, being six from JPB herbarium, five from HUEFS herbarium and 37 of UFRN-Fungos herbarium. The latter has the largest number of exsiccates of this genus in the Northeast, totaling 19 species. Thirty-three specimens were chosen for DNA extraction, resulting in the sequencing of the ITS region of six species and the LSU region of eight species. The phylogenetic trees show that these species sampled in this work are positioned in clades separated from those reported from non-tropical regions, however, this does not change the general topology of the main clades suggested in the works published previously. According to the traditional taxonomy studies we have two species that constitute the second record to the world, *C. pedicelatus* and *C. setosus*; one first record to Brazil, *C. olivaceobrunneus*; and one first record to the Northeast region of *C. bekerleyanus*. Analysis of the molecular data suggests five new species to Science. All DNA sequences of the tropical species sampled were deposited in the GenBank and are new records for the database.

**Key-words:** gasteroid fungi, phylogeny, classification, herbaria, ITS rDNA, LSU rDNA.

## Lista de abreviaturas

|              |                                                         |
|--------------|---------------------------------------------------------|
| <b>10X</b>   | Dez vezes concentrado                                   |
| <b>1X</b>    | Concentração para uso normal                            |
| <b>CTAB</b>  | Brometo de N-cetil-N, N, N-trimetil amônio              |
| <b>DNA</b>   | Ácido desoxirribonucléico                               |
| <b>dNTP</b>  | Desoxirribonucleotídeo                                  |
| <b>EDTA</b>  | Ácido etilenodiaminotetracético                         |
| <b>HUEFS</b> | Herbário da Universidade Federal de Feira de Santana    |
| <b>ITS</b>   | Espaçador Interno Transcrito                            |
| <b>JPB</b>   | Herbário Lauro Pires Xavier                             |
| <b>kb</b>    | Kilobases                                               |
| <b>pb</b>    | Pares de bases                                          |
| <b>PCR</b>   | Reação em cadeia da polimerase                          |
| <b>pmol</b>  | Picomoles                                               |
| <b>PVP</b>   | Polivinilpirrolidona                                    |
| <b>rDNA</b>  | Ácido desoxirribonucléico ribossômico                   |
| <b>RNase</b> | Ribonuclease                                            |
| <b>TAE</b>   | Tampão Tris, Acetato e EDTA                             |
| <b>Tris</b>  | Tri(hidroximetil)aminometano                            |
| <b>U</b>     | Unidade de atividade enzimática                         |
| <b>UFRN</b>  | Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte |
| <b>URM</b>   | Herbário Pe. Camille Torrend                            |
| <b>UV</b>    | Ultravioleta                                            |

## Lista de figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Secção de um <i>Cyathus striatus</i> modificado de Brodie (1975), indicando localização das três paredes do perídio: endo, meso e exoperídio mais a posição dos peridiolos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 16 |
| Figura 2: Imagem retirada de Gomes & Péres-Silva (1988) mostrando espécies com a boca glabra (espécie 4 <i>C. bulleri</i> e espécie 6 <i>C. earley</i> ), e com boca estriada (espécie 5 <i>C. cheliensis</i> ). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 17 |
| Figura 3: Espécie com boca setosa <i>Cyathus setosus</i> . (Desenho de Rhudson H. S. F. Cruz). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 17 |
| Figura 4: Basidioma fechado (seta) com epifragma intacto mostrando a camada mais externa (marrom) e a mais interna (branca). Foto de Iuri G. Baseia.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 18 |
| Figura 5: Funiculo ou Complexo Funicular (Extraído de Brodie, 1956). A, B, C. Mostram as etapas de quando o peridiolo é expandido, mostrando a extensão da peça média (m), a ruptura da bolsa (p) e parte do hapeteron (h). D. Mostra o funículo extendido e ao final o hapeteron; E. Mostra a bainha (s) e a peça média; F. Mostra a inserção das hifas da peça média com a bainha; G. Bolsa aberta mostrando a inserção das hifas do cordão funicular (f) com a parte interna da bolsa; H. Detalhe das hifas entrelaçadas que formam a bolsa; I. Secção do peridiolo mostrando o funículo (túnica ‘t’, córtex ‘c’, cordão funicular ‘f’, hapeteron ‘h’). ..... | 19 |
| Figura 6: <i>Cyathus badius</i> . A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 33 |
| Figura 7: <i>Cyathus berkeleianus</i> . A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 34 |
| Figura 8: <i>Cyathus earlei</i> . A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 36 |
| Figura 9: <i>Cyathus gracilis</i> . A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 38 |
| Figura 10: <i>Cyathus helenae</i> . A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 38 |
| Figura 11: <i>Cyathus limbatus</i> . A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 41 |
| Figura 12: <i>Cyathus montagnei</i> . A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 42 |
| Figura 13: <i>Cyathus pallidus</i> . A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 44 |
| Figura 14: <i>Cyathus pedicellatus</i> . A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 45 |
| Figura 15: <i>Cyathus poeppigii</i> . A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 47 |
| Figura 16: <i>Cyathus setosus</i> . A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 47 |
| Figura 17: <i>Cyathus striatus</i> . A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 49 |
| Figura 18: <i>Cyathus triplex</i> . A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 50 |
| Figura 19: Reconstrução filogenética de espécies de <i>Cyathus</i> obtida a partir do alinhamento em 545 sítios relativos as regiões ITS. Os valores de Bootstrap(BS) foram obtidos a partir de 1000 repetições. Valores de Probabilidade Posterior(PP) (em %) foram gerados a partir dos métodos de análise bayesiana e somente valores acima de 50% são apresentados. Um exemplar de <i>Marasmius oreades</i> foi usado como grupo externo. Valores de suporte da análise Bayesiana e de Bootstrap (PP/BS) são mostrados nos nós. ....                                                                                                                         | 56 |

Figura 20: Reconstrução filogenética de espécies de *Cyathus* obtida a partir do alinhamento em 761 sítios relativos à região LSU. Os valores de Bootstrap(BS) foram obtidos a partir de 1000 repetições. Valores de Probabilidade Posterior(PP) (em %) foram gerados a partir dos métodos de análise bayesiana e somente valores acima de 50% são apresentados. Um exemplar de *Marasmius oreades* foi usado como grupo externo. Valores de suporte da análise Bayesiana e de Bootstrap (PP/BS) são mostrados nos nós. .... 58

Figura 21: Reconstrução filogenética de espécies de *Cyathus* obtida a partir dos alinhamentos relativos às regiões ITS + LSU. Valores de Probabilidade Posterior (em %) foram gerados a partir do método de análise bayesiana e somente valores acima de 50% são apresentados. Um exemplar de *Marasmius oreades* foi usado como grupo externo. A probabilidade posterior Bayesiana é mostrada nos nós. Grupo 1 marcado em vermelho e Grupo 2 em verde, de azul está o grupo *Striatu*, a cor marrom representa o grupo *Ollum* e a cor laranja representa o grupo *Palludum*. .... 60

### **Lista de tabelas**

|                                                                                                                                                                                    |                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Tabela 1: Diferenças morfológicas entre os gêneros da família Nidulariaceae (Brodie, 1975).....                                                                                    | 22                                   |
| Tabela 2: Fungos oriundos de herbários, identificados por morfologia e com a sequência da região ITS comparada, a partir do BLASTn, com os dados depositados no GenBank.....       | 54                                   |
| Tabela 3: Fungos oriundos de herbários, identificados por morfologia e com a sequência parcial do LSU rDNA comparada, a partir do BLASTn, com os dados depositados no GenBank..... | 55                                   |
| Tabela 4: Chave para identificação de espécies de <i>Cyathus</i> .....                                                                                                             | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |

## SUMÁRIO

|                                                                                   | Pág. |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                               | 13   |
| 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....                                                    | 15   |
| 2.1. Características gerais.....                                                  | 15   |
| 2.1.1 Peridium.....                                                               | 15   |
| 2.1.2. Boca .....                                                                 | 16   |
| 2.1.3. Epifragma .....                                                            | 17   |
| 2.1.4. Peridiolos.....                                                            | 18   |
| 2.1.5.Esporos.....                                                                | 20   |
| 2.2. Classificação .....                                                          | 21   |
| 2.5.Sistemática e filogenia genética.....                                         | 23   |
| 2.4.1. Considerações Gerais.....                                                  | 23   |
| 2.4.2. Situação atual do Gênero <i>Cyathus</i> com base em dados moleculares..... | 24   |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                       | 26   |
| 3.1. Coleta, processamento e herborização.....                                    | 26   |
| 3.2. Estudo dos espécimes .....                                                   | 26   |
| 3.3. Extração de DNA gênomico.....                                                | 27   |
| 3.4. Amplificação de sequência- alvo por PCR.....                                 | 28   |
| 3.5. Análises filogenética.....                                                   | 28   |
| 4. Artigo 1: Revisão do gênero <i>Cyathus</i> em herbários do Nordeste.....       | 30   |
| Introdução.....                                                                   | 30   |

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Material e métodos.....                                                                               | 31 |
| Resultados.....                                                                                       | 31 |
| Considerações Finais.....                                                                             | 48 |
| 5. Filogenia De Espécies Representantes Do Gênero <i>Cyathus</i> Oriundas No Nordeste Brasileiro..... | 53 |
| Introdução.....                                                                                       | 53 |
| Material e métodos.....                                                                               | 54 |
| Resultados.....                                                                                       | 55 |
| Discussão.....                                                                                        | 63 |
| 6.ConsideraçõesFinais.....                                                                            | 65 |
| 7. Bibliograifa.....                                                                                  | 67 |
| 8. Apêndice.....                                                                                      | 74 |

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Cyathus* faz parte da tradicional família *Nidulariaceae* (Dring, 1973; Alexopoulos *et al.*, 1996) e conta atualmente com 45 espécies (Kirk *et al.*, 2008). É caracterizado pela morfologia cônica dos basidiomas, em forma de sino ou vaso, na porção interna se encontram estruturas lenticulares denominadas peridíolos, que abrigam a massa de esporos, conferindo um aspecto de ovos no interior de ninhos, daí vem à denominação popular de fungos ninhos-de-passarinho (Brodie, 1975). Seus basidiomas são pequenos, medindo de 6 a 7 mm, alguns atingem até 10 mm; sua cor pode variar entre marrom-claro, branco, cinza, amarelo ou marrom-ferrugem (Brodie, 1975). O seu basidioma é formado por três camadas distintas, sendo a primeira fechada por uma espécie de tampa, denominada de epifragma, o qual se rompe irregularmente (Lloyd, 1906; Brodie, 1975). Apresenta peridíolos lenticulares, escuros e cobertos, em algumas espécies, por uma túnica fina presa à parede interna do perídio por um funículo. Os basidiosporos são lisos, hialinos com tamanho e forma variável (Lloyd, 1906; Brodie, 1975).

A classificação infragenérica de *Cyathus* variou muito ao longo dos anos. O gênero *Cyathus* foi estabelecido por Haller em 1768 sendo dividido em dois grupos infragenéricos: *Eucyathus* e *Olla*; em seguida, Lloyd (1906) subdividiu o grupo *Eucyathus* em dois e o *Olla* em três totalizando cinco grupos. Na década de 70, Brodie publicou mais de 50 trabalhos e duas monografias onde foram descritas 62 espécies e *Cyathus* foi subdividido em sete grupos: *Striatus*, *Poeppigii*, *Olla*, *Pallidus*, *Triplex*, *Gracilis* e *Stercoreus*. Estes trabalhos são fundamentais para a identificação morfológica dos espécimes deste gênero, no entanto, algumas situações problemáticas ocorrem em função dos limitados caracteres disponíveis e nem sempre é possível chegar a um consenso sobre a espécie em questão.

Sequências de DNA vêm sendo usadas para indicar possíveis detalhes morfológicos previamente ignorados por taxonomistas, visto que a mudança de bases nitrogenadas do DNA pode determinar mudanças na morfologia e essas informações acabam por proporcionar melhor entendimento do processo evolutivo e, conseqüentemente, na sistemática (Pege & Homes, 1998). A grande explosão de estudos moleculares na taxonomia teve início na década de 90, com análises de PCR– Polymerase Chain Reaction (White *et al.*, 1992). Esse processo possibilitou análises de uma pequena quantidade de células fúngicas, de esporos únicos e, em alguns casos, de material herborizado (Carlile & Watkinson, 1994).

Trierveiler-Pereira & Baseia (2009a) mostraram que o gênero *Cyathus* é pouco estudado no Brasil, onde só tinham sido registrados exemplares nas regiões da Amazônia, Sul e Sudeste, sem qualquer registro do gênero para o nordeste brasileiro. Trierveiler-Pereira & Baseia (2009b) revisaram o Herbário URM, constatando a presença do táxon pela primeira vez no nordeste

brasileiro, no estado de Pernambuco. Atualmente, o Brasil conta com 14 espécies registradas de *Cyathus* (Trierweiler-Pereira & Baseia, 2009a, 2009b).

*Cyathus* possui um importante papel ecológico na ciclagem de nutrientes nos ambientes florestais (Lloyd, 1906; Brodie, 1975; Baseia & Milanez, 2001). Existem ainda muitas espécies, com grande potencial na indústria farmacêutica, das quais são obtidos diversos metabólitos (Johri *et al.*, 1972; Brodie, 1975; Ayer & Paice, 1976; Ayer *et al.*, 1976, 1978, 1979). Um exemplo desses metabólitos é a cyathina, uma nova classe de diterpenóides, que apresenta uma evidente atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bolores e leveduras (Liu & Zhang, 2004).

O conhecimento da diversidade biológica é essencial para sua preservação. No caso dos fungos, a falta de conhecimento é alarmante: menos de 7% da diversidade são conhecidos (Hawksworth, 2001; Blackwell, 2011). Pesquisas sobre diversidade de fungos em biomas tropicais têm proporcionado constantemente a descoberta de novas espécies. Estes estudos, no entanto, ainda são preliminares sendo necessários projetos que ampliem o conhecimento dos diversos biomas, principalmente os menos estudados como o semi-árido brasileiro, e permita estabelecer uma boa estratégia de conservação das áreas protegidas.

Assim, trabalhando com a hipótese de que a utilização da ferramenta molecular somada aos dados morfológicos resultará em uma melhor classificação para o gênero *Cyathus*, além de possibilitar a compreensão e delimitação dos caracteres informativos, temos como objetivo ampliar o conhecimento do gênero *Cyathus*, utilizando ferramentas morfológicas e moleculares.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Características Gerais de Nidulariaceae

O gênero *Cyathus* apresenta seus caracteres mais marcantes na forma do basidioma, que é em forma de vaso ou funil, em seu interior se encontram as estruturas lenticulares chamadas de peridiólos, onde se encontram os esporos (Brodie, 1975). O ciclo de vida e a reprodução sexuada destes fungos condizem com o da maioria dos basidiomycetes em que ocorre somatogamia com posterior fusão dos núcleos sexualmente compatíveis, seguida de meiose resultando na produção de quatro núcleos haploides (Brodie, 1975). Este grupo apresenta um tipo de dispersão característico chamado de “*splash-cups*”, pois seus peridiólos são dispersos através do impacto da gota de chuva dentro do basidioma, arremessando os peridiólos que se prendem à vegetação do entorno pelo cordão funicular (Martin, 1927). Brodie (1956) descreve a estrutura do cordão funicular como sendo importante na filogenia da família Nidulariaceae, ressaltando que os gêneros mais ancestrais (*Nudularia*, *Micocalia* e *Nidula*) não teriam o cordão funicular, e os mais recentes (*Crucibulum* e *Cyathus*) o teriam.

A morfologia do basidioma maduro pode variar, exceto em *Mycocalia* e *Nidularia*, nas formas de cúpula, vaso ou ainda de um sino invertido (Brodie, 1975). Nas duas exceções citadas, os basidiomas são subcilíndricos a globosos. Na taxonomia do gênero, várias características têm sido utilizadas no decorrer da história na tentativa de descrever as diversas espécies que existem, no entanto, algumas destas se mostraram mais efetivas na caracterização do táxon e estas serão detalhadas a seguir.

#### 2.1.1 Perídio

Em *Cyathus* a parede (perídio no senso stricto) é distintamente formada por três camadas (Figura 1) (Brodie, 1975): exoperídio (a mais externa), mesoperídio (fica entre a camada mais externa e a mais interna) e endoperídio (a mais interna). Na taxonomia as camadas que possuem destaque são a externa e a interna. Estas podem variar na coloração: aqui o exoperídio e endoperídio são observados quanto à coloração onde o castanho é o mais comum, podendo variar para um tom mais escuro, tendendo ao preto, ou para um tom mais claro, tendendo ao branco; revestimento: o exoperídio é frequentemente hirsuto ou tomentoso; e superfície: que pode apresentar uma série de estrias longitudinais tanto no exoperídio (Figura 1) como no endoperídio (Figura 1). Esta última característica é fundamental nas chaves artificiais de identificação.

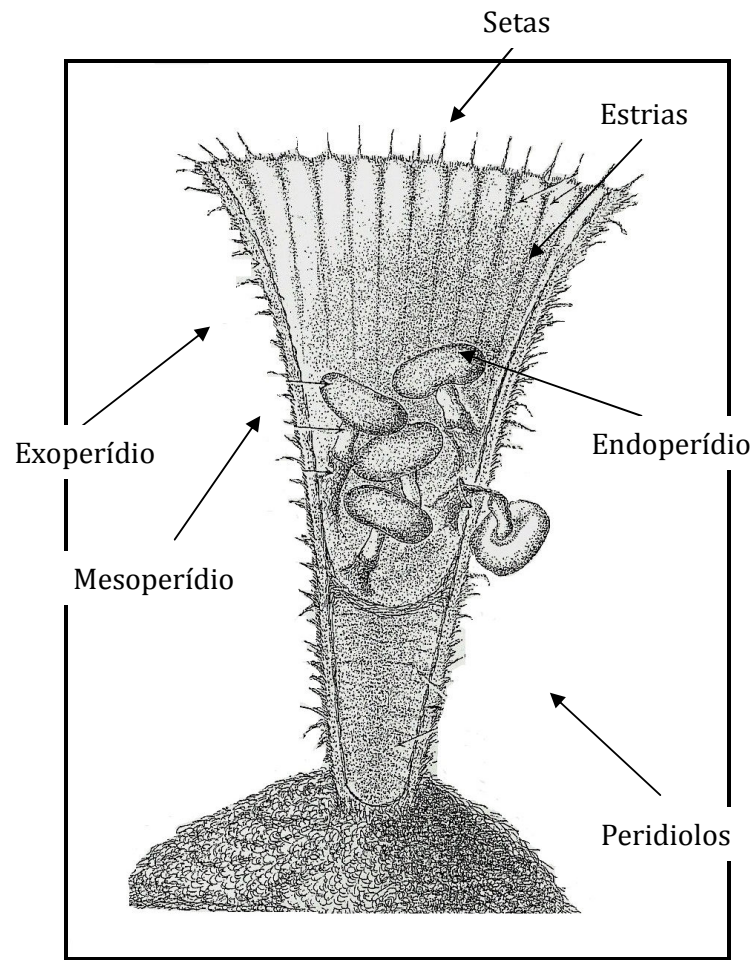


Figura 1: Secção de um *Cyathus striatus* modificado de Brodie (1975), indicando localização das três paredes do perídio: endo, meso e exoperídio mais a posição dos peridiolos.

### 2.1.2. Boca

A abertura apical é referida como boca que pode ser mais ou menos revoluta. Para descrição de espécimes, o que é levado em consideração é a sua margem que pode assumir ao menos três características (Brodie, 1975): glabro (Figura 2), quando a margem se apresenta lisa; fimbriado (Figura 2), quando é possível observar fímbrias na margem; e setoso (Figura 3), quando observamos na margem uma série de setas.

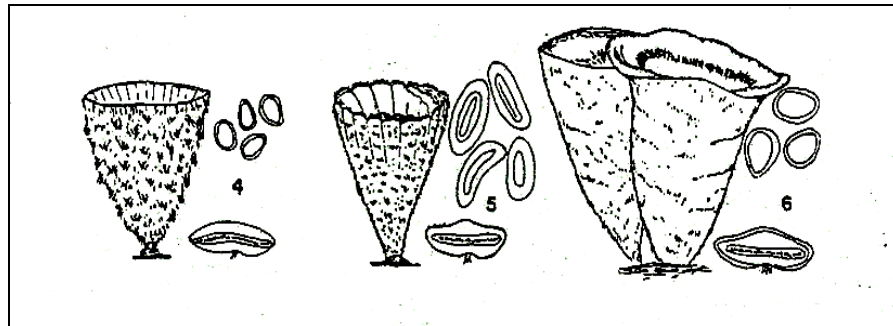


Figura 2: Imagem retirada de Gomes & Pères-Silva (1988) mostrando espécies com a boca glabra (espécie 4 *C. bulleri* e espécie 6 *C. earley*), e com boca estriada (espécie 5 *C. cheliensis*).

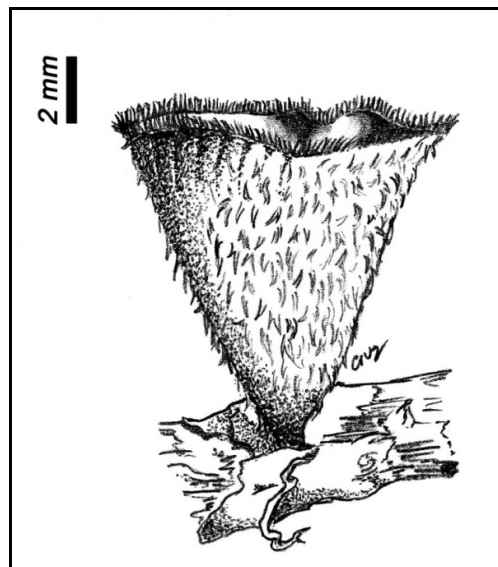
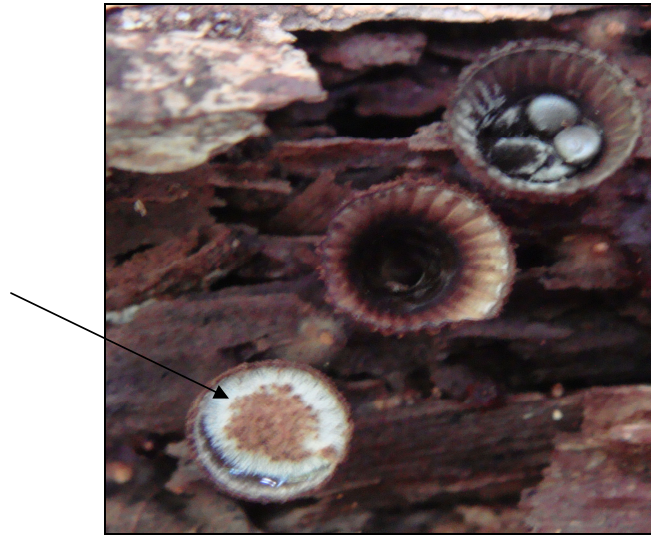


Figura 3: Espécie com boca setosa *Cyathus setosus*. (Desenho de Rhudson H. S. F. Cruz).

### 2.1.3. Epifragma

Uma fina membrana (Figura 4), denominada epifragma, que reveste a boca está presente em basidiomas jovens e, de acordo com Lloyd (1906), consiste em duas camadas: uma mais externa, sendo peluda ou tomentosa e de mesma consistência do exoperídio; e outra mais interna, fina e branca que se estica através da boca (como se fosse a tampa de um tambor). Esta membrana está ausente em *Nidularia* e *Mycocalia* (Brodie, 1975). Em *Crucibulum* e *Nidula*, as duas camadas persistem até o rompimento do epifragma enquanto que, em *Cyathus*, a camada tomentosa vai se degradando, deixando a mais interna exposta (Lloyd, 1906) e, com o desenvolvimento do

basidioma, o perídio se expande lateralmente de forma gradual até a completa ruptura do epifragma (Brodie, 1975).



**Figura 4: Basidioma fechado (seta) com epifragma intacto mostrando a camada mais externa (marrom) e a mais interna (branca). Foto de Iuri G. Baseia.**

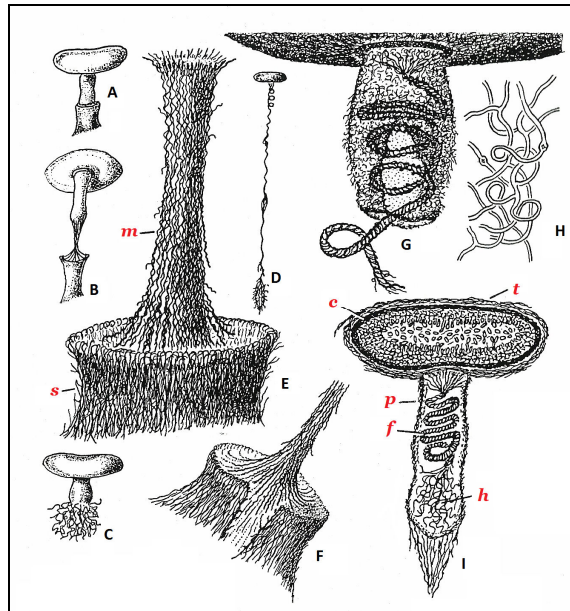
#### **2.1.4. Peridíolos**

Correspondem aos pequenos ‘ovos’ encontrados no interior dos basidiomas, que são os esporângios, na literatura específica, são encontrados sob a denominação de peridíolos (Lloyd, 1906). São lenticulares, circulares ou irregulares, normalmente com um ou dois milímetros de diâmetro (raramente três) (Brodie, 1975). Um peridíolo seccionado (Fig. 5) mostra em seu interior uma série de complexas estruturas cuja porção central (geralmente esbranquiçada) contém uma massa de basidiósporos imersa em um meio gelatinoso (Lloyd, 1906). A secção de um peridíolo mostra ainda uma espessa camada escura que corresponde ao córtex, podendo ser de uma camada (homogêneo), ou de duas camadas, das quais a mais externa tende a se separar da outra quando a estrutura é cortada (Brodie, 1952). É preciso cautela ao analisar essa característica, pois a presença da túnica pode revelar uma falsa camada do córtex, levando o pesquisador a caracterizá-lo como de córtex duplo (Brodie, 1952). A morfologia externa do peridíolo possui, ainda, outras estruturas como o funículo e a túnica.

O funículo é formado por uma série de estruturas (Fig. 5) que confere à espécie a capacidade de dispersão. O primeiro estudo científico acerca da sua estrutura e função foi realizado, de acordo com Brodie (1956), pelos irmãos Tulasne. No entanto, ainda de acordo com Brodie (1956), eles não conseguiram expor, apesar de todo o detalhamento estrutural fornecido no trabalho, a real função desta estrutura. Assim sendo, a importância do funículo ou complexo funicular reside no mecanismo de dispersão (*splash-cup*) das espécies deste grupo (Brodie, 1956). Quando o peridíolo

é expulso do basidioma, devido à pressão da gota de chuva ao cair no interior do basidioma cupulado, o funículo (Fig. 5 '1, 2, 3') se expande e, ao atingir um substrato (tronco, folha, etc), prende-se através do hapteron (Fig. 5 'A, B, C') e, conseqüentemente, o cordão se estica todo e enrola-se junto ao substrato (Brodie, 1956). Desta forma, o complexo funicular possui um papel crucial no processo de disseminação do peridiolo.

Basicamente, o complexo funicular consiste na porção (estipe ou cordão) que se prende à parede interna do perídio até a base do peridiolo (Fig. 5 X D) (Brodie, 1975). Em *Cyathus*, existem três partes: 1) bainha (Fig. 5 X E) – rede tubular de hifas largamente presa à parede interna do perídio; 2) peça média (Fig. 5 X E-s) – corresponde à porção em que as hifas se unem intimamente de tal forma que, em seu conjunto, perde a forma de cordão tornando-se mais espessa; 3) bolsa (Fig. 5 X G) – a peça média se expande até o topo onde as hifas estão presas à parte superior do funículo.



**Figura 5: Funículo ou Complexo Funicular (Extraído de Brodie, 1956). A, B, C. Mostram as etapas de quando o peridiolo é expandido, mostrando a extensão da peça média (m), a ruptura da bolsa (p) e parte do hapteron (h). D. Mostra o funículo extendido e ao final o hapteron; E. Mostra a bainha (s) e a peça média; F. Mostra a inserção das hifas da peça média com a bainha; G. Bolsa aberta mostrando a inserção das hifas do cordão funicular (f) com a parte interna da bolsa; H. Detalhe das hifas entrelaçadas que formam a bolsa; I. Secção do peridiolo mostrando o funículo (túnica 't', córtex 'c', cordão funicular 'f', hapteron 'h').**

Na maioria das espécies, existe uma fina membrana que reveste os peridiolos, geralmente de coloração esbranquiçada, denominada de 'túnica' (Fig. 5 X I-t) (Lloyd, 1906). Em *Crucibulum*, a

túnica é mais espessa e quase sempre é possível visualiza-la quando desidratado (Brodie, 1975). Já no gênero *Cyathus*, objeto deste trabalho, é bastante difícil sua visualização, principalmente em espécimes desidratados. Além disso, ao seccionar o peridíolo ou o basidioma, frequentemente a túnica se perde (Brodie, 1975).

### 2.1.5. Esporos

No interior dos peridíolos se localizam os basidiosporos unicelulares e pouco coloridos. Sua forma varia de ovóide, esférica, elipsóide a ciatiforme (quando o esporo apresenta-se curvado). O tamanho do esporo vai de 4  $\mu\text{m}$  em *Cyathus microsporus* podendo chegar até 50  $\mu\text{m}$  em *C. poeppigii* (Brodie, 1975). É comum que ocorra uma variação considerável no tamanho de esporos e até mesmo dos peridíolos, dependendo da espécie. Isso, geralmente, se dá devido à maturação diferenciada no interior dos peridíolos. Em algumas espécies, os basidiosporos podem apresentar paredes delgadas ou espessas devido ao esporo ter a capacidade de continuar a se desenvolver mesmo após ter se separado do basídio. Esta variação na espessura da parede do esporo consiste em critério de identificação ao nível de espécie (Brodie, 1975).

Os basidiosporos podem apresentar estruturas conspícuas, discerníveis apenas ao microscópio, como, por exemplo, o apículo ilustrado por Brodie (1967). Na ultraestrutura da superfície dos basidiosporos, a superfície é lisa (Eckblad, 1971). Diferentes espécies podem ser discernidas através da arquitetura da superfície dos esporos. No entanto, os resultados desses estudos para o gênero não são considerados relevantes, portanto, não se faz necessária a microscopia eletrônica de varredura nessas espécies.

A natureza química da parede é, principalmente, quitinosa ou uma mistura de quitina e hemicelulose (Brodie, 1975). A parede dos esporos pode ser delgada, se comparada com o seu diâmetro, como ocorre em *C. olla* (Batsch.) Pers., ou muito espessa, como em *C. crassimurus* e *C. stercoreus*. Ao microscópio de luz, as paredes dos esporos de algumas espécies dão a impressão de serem estriadas ou compostas por várias camadas. Espécies como *C. olla* apresentam esporos pequenos, mas em grandes quantidades, enquanto que *C. stercoreus* apresenta uma pequena quantidade de esporos, no entanto, são de tamanho relativamente maior (20–35 x 20–25  $\mu\text{m}$ ). Além disso, como relatado por Lloyd (1906), alguns peridíolos não possuem basidiosporos.

Comumente, quatro esporos são formados em cada basídio, como em *C. striatus*, no entanto, também podem ser formados um dois ou até três, dependendo da espécie e, em alguns espécimes de *C. stercoreus*, esse número pode chegar a oito (Martin, 1927). Como é característico dos fungos gasteróides, *Cyathus* também não apresenta descarga ativa de esporos, apresentando basidiosporos sésseis no basídio.

A maturação procede com o colapso do basídio e sua posterior gelatinização. Os tecidos de lignina nas paredes dos peridiólos são também gelatinizados, empurrando os esporos para o centro do peridiólo, que ficam submersos em uma matriz gelatinosa. Quando os esporos são liberados de seus basídios, eles também ficam livres dos esterigmas. Os basidiosporos são geralmente binucleados e a maturação é resultado de divisões mitóticas, porém, algumas espécies podem apresentar um núcleo em cada esporo e outras mais de dois, dependendo das divisões nucleares. Em todos os representantes do gênero, o micélio é homocariótico.

É comum que experiências com germinação de fungos gasteróides não tenham sucesso. O gênero *Cyathus*, portanto, não foge à regra apresentando uma baixa porcentagem de germinação em vários experimentos (Brodie, 1975). Algumas espécies cujos basidiomas são ingeridos por herbívoros têm esporos que entram em um tipo de dormência, pois o trato digestivo não compõe um ambiente favorável à germinação, embora essa teoria ainda não esteja comprovada experimentalmente.

## 2.2. Classificação

Talvez o primeiro tratamento crítico que o gênero *Cyathus* tenha recebido seja em 1601 com o botânico Clusius (Brodie, 1975). Registros anteriores a esta data até o momento não foram encontrados e é unanimidade entre os principais autores que trabalharam com este táxon que o ponto de partida para estudo do gênero seja a partir de Clusius (White, 1902; Brodie, 1975). Nesta época, não havia tantos níveis de classificação como conhecemos hoje e, basicamente, os seres vivos se diferenciavam em Plantas e Animais, por isso o táxon era constantemente estudado por botânicos que eventualmente os classificaram como fungos produtores de sementes (Brodie, 1975). Estas idéias perduraram por um bom tempo, mesmo após a publicação da grande obra de Linnaeus (1735), que lançava formalmente, talvez, uma das primeiras classificações dos seres vivos, estando os fungos (inclusive *Cyathus*) junto com as plantas.

A definição de ordem e família começou a ser discutida e interpretada com as obras de Persoon (1801), estando *Cyathus* na ordem *Sascocarpi*, e Fries (1821), estando *Cyathus* na subordem Nidulariaceae (Martinez, 1956). Posteriormente, Berkeley (1860) eleva a categoria de subordem de Fries para ordem e logo em seguida Winter agrupa os gêneros *Nidularia*, *Cyathus*, *Crucibulum* e *Sphaerobolus* em uma família (Martinez, 1956). Em 1889, Schroeter separa *Sphaerobolus* criando a família Sphaerobolaceae a qual Fischer (1900) a coloca na ordem Plectobasidiinae deixando a ordem Nidulariineae com uma única família (Martinez, 1956).

Em trabalhos como Coker & Couch (1928), Cunningham (1942), Bottomley (1948), Zeller (1949) e vários outros colocam Nidulariaceae e Sphaerobolaceae em uma única ordem Nidulariales.

Durante muito tempo *Cyathus* pertenceu à ordem Nidulariales (Cunningham, 1944), a qual compreendia duas famílias: Sphaerobolaceae J. Schröt. ou “cannon balls” e Nidulariaceae Dumort, também conhecidos como “Bird’s Nest Fungi” (Dring, 1973; Alexopoulos *et al.*, 1996). No entanto, a partir de trabalhos feitos com base em dados moleculares, essa ordem foi desconsiderada e suas famílias foram incorporadas em duas outras ordens (Zhao *et al.*, 2007; Kirk *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008). A família Sphaerobolaceae foi rearranjada para a ordem Geastrales (Hosaka *et al.*, 2006) e Nidulariaceae para a ordem Agaricales Underw.

A família Nidulariaceae fazia parte do grupo artificial dos fungos gasteroides por apresentar liberação passiva dos esporos e desenvolvimento angiocárpico, no qual os esporos ficam no interior do basidioma que permanece fechado durante toda a fase de desenvolvimento (Alexopoulos *et al.*, 1996). Até então, a família Nidulariaceae apresentava cinco gêneros (Tab. 1): *Mycocalia* Palmer, *Nidularia* Fr., *Nidula* V.S. White, *Crucibulum* Tul. & C. Tul. e *Cyathus*. Também fazia parte desse grupo o gênero *Sphaerobolus* Tode.

Tabela 1: Diferenças morfológicas entre os gêneros da família Nidulariaceae (Brodie, 1975).

| Gênero            | Características                                                                                                                                                                          |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Nidularia</i>  | <input type="checkbox"/> Perídio com apenas uma parede robusta formada por hifas espinhosas.<br><input type="checkbox"/> Peridiolos claros                                               |
| <i>Mycocalia</i>  | <input type="checkbox"/> Perídio efêmero podendo estar ausente composto por apenas uma parede,<br><input type="checkbox"/> Peridiolos geralmente de cor castanho                         |
| <i>Nidula</i>     | <input type="checkbox"/> Forma de vaso ou funil,<br><input type="checkbox"/> Perídio formado por apenas uma camada,<br><input type="checkbox"/> Peridiolo não apresenta cordão funicular |
| <i>Crucibulum</i> | <input type="checkbox"/> Forma de vaso ou funil<br><input type="checkbox"/> Perídio com apenas uma camada<br><input type="checkbox"/> Cordão funicular presente simples                  |
| <i>Cyathus</i>    | <input type="checkbox"/> Forma de vaso ou funil<br><input type="checkbox"/> Perídio com três camadas<br><input type="checkbox"/> Cordão funicular complexo com presença do “hapteron”    |

Tulasne & Tulasne (1844) dividiram o gênero em duas seções: a seção *Eucyathus*, composta pelas espécies que apresentavam plicações no endoperídio; e a seção *Olla*, com espécies que não as apresentavam (Lloyd, 1906).

Lloyd (1906), em sua monografia, divide o táxon em cinco grupos infragenéricos (Tabela 1), dividindo, ainda, *Eucyathus* em duas subseções e *Olla* em três. Brodie (1975) divide o gênero em sete grupos infragenéricos: *Olla*, *Pallidus*, *Triplex*, *Gracilis*, *Stercoreus*, *Poeppigii* e *Striatus*. A classificação de Brodie tem sido a mais amplamente utilizada até os dias atuais, no entanto se baseia apenas em dados morfológicos, apesar de em seu livro abordar alguns aspectos ecológicos que não são utilizados na taxonomia. Em todas as classificações, a presença ou ausência de plicação é característica primária na partição dos grupos, seguida de presença ou ausência de túnica nos peridíolos, tipos de pêlos e forma do corpo de frutificação (Lloyd, 1906; Brodie, 1975).

Segundo Zhao *et al.* (2007), existem discrepâncias com este sistema de classificação, como, por exemplo, no grupo “*Olla*”, no qual, supostamente, não deveria existir plicações, existe uma forma (*Cyathus olla* f. *anglicus* (Lloyd) H.J. Brodie) que possui o terço superior do endoperídio distintamente sulcado (Lloyd, 1906; Brodie, 1952). Brodie (1975), em uma nota sobre o holótipo de *C. hookeri* Berk, registrou que um membro do grupo “*Olla*” apresentava corpo de frutificação fracamente plicado internamente, demonstrando, assim, que a plicação do perídio é uma característica taxonômica questionável, assim como os pêlos do perídio, que são facilmente afetados pela idade ou condições ambientais. A classificação mais atual foi proposta por Zhao *et al.* (2007), na qual é sugerida uma nova classificação infragenérica baseada nas relações filogenéticas geradas a partir de sequências de rDNA e suportada pelos dados morfológicos. Nesta classificação, a principal característica para separar os clados é o tamanho dos basidiosporos.

## **2.3. Sistemática e Filogenia**

### **2.3.1 Considerações Gerais**

Um dos avanços mais importantes nas duas últimas décadas tem sido a aplicação de dados de ácidos nucleicos a problemas de sistemática. Neste período, houve inúmeras elucidações de problemas sistemáticos, visto que os dados moleculares têm provido uma poderosa ferramenta de estudo da história evolutiva, de forma a possibilitar a reconstrução da filogenia dos maiores grupos de organismos vivos (Futuyma, 1992; Graur & Li, 2000). O emprego de dados moleculares traz uma série de vantagens sobre o estudo sistemático tradicional. Por exemplo, a partir de dados de ácidos nucleicos é possível a comparação de qualquer grupo de organismo devido a sua composição semelhante. A mesma coisa não seria possível com dados da filogenética clássica, feita através de dados morfológicos (Nei & Kumar, 2000). Outro fator importante é que mudanças evolucionárias dos caracteres moleculares estão associadas a um padrão que, atrelado a modelos matemáticos, pode formular a mudança e comparar os ácidos nucleicos de organismos menos relacionados.

O rápido crescimento das técnicas de sequenciamento de DNA, da teoria filogenética e da bioinformática tem levado os pesquisadores a rever a classificação de todos os ramos da árvore da vida (Moncalvo *et al.*, 2002). Para os fungos, o ritmo de descobertas sobre relações naturais também tem sido enormemente acelerado pelas novas evidências a partir da sistemática molecular. Os estudos moleculares demonstraram, por exemplo, que os Chytridiomycetes, Zygomycetes, Glomeromycetes, Ascomycetes e Basidiomycetes formam um grupo monofilético irmão do grupo dos animais, enquanto que os Myxomycetes e Oomycetes, antes classificados como fungos, se encontram fora do Reino Fungi, estando mais próximos dos Protoctistas (Moncalvo, 2002 Bruns *et al.*, 1992).

Estudos filogenéticos envolvendo rDNA apoiam a monofilia dos táxons tradicionais de Basidiomycetes, no entanto, também demonstram a diferença de vários clados compostos por membros de diferentes grupos tradicionais (Swann & Taylor, 1993; Hibbett *et al.*, 1997; Bruns *et al.*, 1998). Nos Homobasidiomycetes, os cogumelos lamelados parecem ter evoluído de antepassados morfologicamente diversos (Moncalvo, 2002 apud Hibbett *et al.*, 1997; Thorn *et al.*, 2000; Hibbett & Thorn, 2000), formando o polifilético grupo Agaricales. Também tem sido evidenciado que Gasteromycetes evoluíram a partir de antepassados sem lamelas ou poróides. Estas conclusões abrem caminho para a desconstrução de taxas artificiais, como os Gasteromicetos, e redefinição de outros com contexto filogenético (Moncalvo *et al.*, 2002).

### **2.3.2. Situação atual de *Cyathus* com base em dados moleculares**

No início desse século, com a introdução de análises filogenéticas moleculares, ocorreram grandes mudanças dentro do grupo dos Gasteromicetos. Hoje não restam dúvidas de que os Gasteromicetos evoluíram de maneira independente em diferentes linhagens dentro de Basidiomycetes. Estas mudanças começaram com os trabalhos de Hibbett *et al.* (1992, 1997) onde ele mostra que a dispersão passiva dos esporos em Gasteromicetos era derivado de diversas perdas do modo de descarga passiva, como consequência ocorreram formas diversas de corpo de frutificação e mecanismos de dispersão construídas de forma independente sugerindo já a que não se tratava de um grupo monofilético.

O próximo trabalho relevante para os Gasteromicetos também feito por Hibbett *et al.* (2002) tratou da evolução do basidioma em holobasidiomycetes que ele divide em lamelados (cogumelos) e não lamelados (puff balls) e mais uma vez a ideia de que os Gasteromicetos são monofilético é colocada a baixo quando ele sugere que a evolução morfológica tem sido marcada por formação de clados independentes. No mesmo ano Moncalvo (2002) lança um trabalho onde ele divide os Gasteromicetos em três clados diferentes, o clado gomphoid-phalloid, o clado Agaricaceae e o Nidulariaceae.

O trabalho publicado por Zhao (2004) é o primeiro a trazer estudos moleculares apenas com o gênero *Cyathus*, feito através de análises de RAPD realizadas em 43 amostras, em um total de 18 taxa, foram criada duas novas espécies para o gênero, no entanto, esses estudos não revelavam as relações entre as espécies dentro do gênero. Trabalhos posteriores (Hibbett, 2006, 2007; Hosaka *et al.*, 2006) trouxeram sequências de *Cyathus*, já alocando estas espécies na família Agaricaceae com a proposta de eliminação da família Nidulariaceae. Assim os membros da ordem Nidulariales passaram para família *Agaricaceae* dentro da ordem Agaricales, com exceção da família *Sphaerobolaceae* que foi inserida no clado Gomphoid Phalloide, junto com um diversificado grupo de espécies incluindo *Geastrum*, *Pseudocolus*, *Ramaria*, entre outros (Hibbett *et al.*, 1997; Moncalvo *et al.*, 2002; Geml *et al.*, 2005).

Todos esses estudos baseados em dados moleculares que incluíram espécies de *Cyathus* mostram que este gênero se encontra dentro do clado eugaricus, no trabalho de Matheny *et al.* (2006) a família Nidulariaceae representada pelas espécies *Crucibulum laeve* e *Cyathus striatus* aparece como grupo irmão de Cystodermataceae, mas sem um bom suporte de bootstrap. Estudos filogenéticos realizados por Zhao *et al.* (2007) utilizando as regiões ITS e LSU feitos com sequências de 22 táxons, teve como objetivo reexaminar o gênero *Cyathus* com auxílio de dados moleculares, e indicaram que trata-se de um gênero monofilético incluindo três grupos infra-genéricos suportados também por dados morfológicos. No entanto, este trabalho não incluiu espécies oriundas da América do Sul, ficando restrito apenas a espécies de países como China, Jamaica, USA, Canadá, Índia, Hawaii e Tanzânia. Portanto, fazem-se necessários mais estudos sobre este grupo de fungos nestas áreas para que as relações filogenéticas sejam bem compreendidas ao nível mundial, podendo ainda ser observado se ocorrem mudanças significativas nas sequências de DNA com relação a variações climáticas e espaciais.

### 3. MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta, processamento e herborização dos espécimes.

As coletas foram realizadas nos meses considerados com uma alta taxa de pluviosidade, março a julho, de 2010 e 2011, nas seguintes regiões: Parque Estadual Dunas de Natal no estado do Rio Grande do Norte, Reserva Ecológica Charles Darwin, Parque Ecológico Dois Irmãos no estado de Pernambuco, e uma coleta no estado da Paraíba na Reserva Ecologica Guaribas. Sempre no período da manhã e início de tarde seguindo a metodologia adaptada de Muller *et al.* (2004) que inclui os seguintes procedimentos: coleta de material no campo e, quando possível, fotografando-os, como o material a ser examinado não se degrada nem perde a cor facilmente é depositado em maletas de coleta; grupos que apresentam apenas basidiomas sem peridiolos, material velho ou jovem em demasia foram descartados, no entanto vale ressaltar a importância de se obter o maior número de estágios de desenvolvimento em uma mesma amostra; geralmente parte do material do entorno é coletado e anotações como tipo de substrato, agregação e incidência de luz são anotados.

Após as coletas as amostras foram devidamente etiquetadas com informações como nome do coletor, data, local de coleta, substrato. O material foi enviado para o laboratório de Taxonomia de Fungos no Departamento de Micologia na UFPE, onde ocorreu o processo de secagem em um desidratador elétrico a uma temperatura constante de 40°C por um tempo de aproximadamente de 24 horas. Após a desidratação as amostras foram transferidas para sacos transparentes de plásticos com zíper e armazenadas em ambiente seco e ventilado com o objetivo de evitar contato com outros materiais e umidade. O material foi colocado em caixas de papelão com tamanho adequado com o número do tombamento e as devidas informações solicitadas pelo herbário.

#### 3.2. Estudo dos espécimes

O material obtido, seja a partir de coleta ou mesmo de exsicatas obtidas nos herbários do Nordeste, foi analisado no Laboratório de Biologia de Fungos do Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e, eventualmente, no Laboratório Didático II do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. A metodologia empregada seguiu os trabalhos de White (1902), Lloyd (1906), Brodie (1975, 1983), Baseia & Milanez (2003) e Zhao *et al.*, (2008).

A análise detalhada dos caracteres com importância taxonômica consiste em duas etapas: 1) macroscópica, onde com o auxílio de microscópio estereoscópico observa-se o tamanho e coloração dos basidiomas, da boca, da margem da boca, da região basal, do interior e exterior (incluindo a consistência de ambas as regiões). Os peridiolos, que é uma estrutura com importantes caracteres

taxonômicos, são analisados com relação às dimensões, forma, cor e textura. Posteriormente, uma secção longitudinal é feita no peridíolo para verificar se o mesmo possui córtex duplo ou simples (característica utilizada na maioria das chaves). Ainda no peridíolo, uma estrutura utilizada em muitos trabalhos, a túnica, que consiste em uma fina camada fortemente aderida ao córtex. Para sua visualização seguiu-se a metodologia proposta por Lloyd (1906) onde os peridíolos são acondicionados em recipientes com água por até 72 horas facilitando assim a separação da túnica com o córtex e, então, características como cor, espessura e qualquer outra particularidade são registradas. Todas as mensurações foram efetuadas utilizando régua milimetrada (assim sendo com medições na ordem de 1 mm) ou utilizando-se de um paquímetro digital.

A análise microscópica consiste unicamente na análise dos esporos que caracteristicamente do gênero é liso e hialino, no entanto sua forma pode variar desde globoso até oval. O tamanho é uma característica importante para a segregação de espécies (sendo por isso utilizado como critério taxonômico). Para confeccionar uma lâmina de esporos tomou-se um ou mais peridíolos e procedeu-se para a remoção de toda a camada externa (córtex e túnica) a região himenial, mantendo apenas a região esbranquiçada que foi macerada utilizando KOH a 3% ou álcool isopropílico. Em seguida, a lâmina é montada com KOH ou com PVLG para lâminas permanentes. As mensurações foram efetuadas seguindo a metodologia modificada de Zhao *et al.* (2008), onde são medidas as dimensões de tamanho e largura dos basidiomas e suas médias (L= média do comprimento dos esporos, W= media da largura dos esporos e Qm= é a média do quociente da largura e comprimento do esporo).

### 3.3. Extração do DNA Genômico

Para trituração inicial foi utilizado nitrogênio líquido. Utilizando FastPrep, foi feita a homogeneização do basidioma em tubos de 2 mL contendo pérolas de vidro (0,25 g de 425-600µm; 0,25 g de 150-212µm – SIGMA; 2 unidades de 0,4 mm, lavadas com ácido) e tampão CTAB (100 mM Tris-HCl pH 8, 1,4 M NaCl, 2% CTAB, 20 mM EDTA, 1% PVP) a 5,5 m/s por 40 s, por duas vezes. Posteriormente, o produto pulverizado foi incubado a 65°C por 30 min. Após a incubação, o extrato bruto foi lavado com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v), precipitado com isopropanol, lavado com etanol 70% e, por último, ressuscitado em água ultrapura. Em algumas espécies também foi usado fenol, resultando em produtos mais fortes e com maior porcentagem de sucesso na PCR

O sucesso das extrações foi verificado através de eletroforese em gel de agarose 1%, usando 5 µL do produto da extração. Os géis foram corados com GelRed™ e visualizados sob luz UV, quando também foram fotografados. O DNA foi armazenado em freezer (-20°C) até seu uso em reações de PCR.

### 3.4. Amplificação da Sequência- Alvo por PCR

As reações de amplificação de fragmentos do ITS rDNA foram realizadas a partir do DNA genômico extraído dos espécimes, em termociclador (TECHNE TC-512) contendo, em tubos de 0,2 mL, um volume reacional de 25 µL com os seguintes componentes: 2,5 µL do Tampão 10X de PCR, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM, 0,5 µL de dNTPs a 2 mM, 1U de Taq Polimerase, 0,5 µL de cada *primer* ITS1 e ITS4 para região ITS (White *et al.*, 1990) a 10 µM, e 5 µL do DNA alvo diluído. Um controle negativo, contendo todos os componentes exceto DNA, foi utilizado em cada procedimento para detectar possíveis contaminações. O programa de amplificação da região ITS envolveu: 1 ciclo inicial de desnaturação por 5 min a 94°C; seguido de 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 30 s, anelamento dos *primers* a 62°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min; além de uma extensão final de 5 min a 72°C.

Para a região LSU foram utilizados os primers LR07 e LR7 (White *et al.*, 1990) com os seguintes reagentes para um volume final de 25 µL: 2,5 µL 10x Tampão KCl, 1,5 µL de dNTPs, 1,0 µL MgCl<sub>2</sub>, 1,0 µL de cada primers, 0,2 µL de Taq Polimerase e aproximadamente 5 µL do DNA alvo diluído. O programa de amplificação desta região 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.

Os produtos das reações de PCR (5 µL) foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com Gel Red, sob luz UV e fotografados. Os produtos de amplificação foram purificados com kit de purificação (PureLink PCR Purification Kit, Invitrogen) e encaminhados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP.

### 3.5. Análise Filogenética

Os cromatogramas do sequenciamento foram analisados para auxiliar na edição manual das sequências. Após a edição, todas as sequências foram utilizadas para busca das sequências mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn. Os acessos que apresentaram a maior porcentagem de identidade com as sequências em estudo, considerando a melhor combinação de “score” e “e-value”, foram selecionadas para as análises filogenéticas.

As sequências experimentais foram alinhadas em conjunto com as recuperadas da base de dados, utilizando o programa Clustal X (Larkin *et al.*, 2007). Os alinhamentos foram, posteriormente, editados manualmente, utilizando o programa BioEdit (Hall, 1999) e realinhados no Clustal X. As análises filogenéticas foram realizadas com o programa PAUP\* 4.0B10 (Swofford, 2004). Buscas heurísticas no conjunto de dados ITS e LSU e na combinação destes dois foram realizadas seguindo quatro critérios de otimização: máxima verossimilhança e análise

bayesiana (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Huelsenbeck et al., 2001). Para máxima parcimônia, foram limitadas 5000 árvores com 1000 repetições. A escolha do melhor modelo de substituição foi feita com o programa Modeltest, sendo o mesmo modelo utilizado tanto para as análises Bayesianas como para a máxima verossimilhança.

A Probabilidade Posterior Bayesiana (PP) foi calculada com o MrBayes 3.0B4 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Um milhão de gerações foram executadas por quatro Cadeias Markovianas e amostradas a cada 100 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.000 árvores foram descartadas como parte da fase “burn-in”, e as restantes foram usadas para calcular a probabilidade posterior. As árvores foram visualizadas no TreeView e exportadas para programas gráficos. Para concatenar as regiões ITS e LSU foi utilizado a rotina CONCAT do Phyutility (Smith, S. A. & Dunn, C. W., 2008).

#### 4. REVISÃO DO GÊNERO *CYATHUS* (BASIDIOMYCOTA) EM HERBÁRIOS DO NORDESTE BRASILEIRO<sup>1</sup>

RESUMO: Quarenta e seis exsicatas depositadas nos herbários JPB, HUEFS e UFRN foram estudadas e identificadas, totalizando treze espécies: *Cyathus badius*, *C. berkeleyanus*, *C. crassimurus*, *C. earlei*, *C. gracilis*, *C. helenae*, *C. intermedius*, *C. limbatus*, *C. montagnei*, *C. olivaceus-bruneus*, *C. pallidus*, *C. pedicellatus*, *C. poeppigii*, *C. setosus*, *C. striatus* e *C. triplex*. *Cyathus pedicellatus* constitui o segundo registro mundial e *C. setosus* o primeiro registro para o Brasil. Foram feitas descrições, comentários taxonômicos e ilustrações detalhadas do material estudado.

#### INTRODUÇÃO:

O gênero *Cyathus* (Haller, 1768) faz parte da família *Nidulariaceae* (Dring, 1973; Alexopoulos *et al.*, 1996) e conta atualmente com 45 espécies (Kirk *et al.*, 2008). É caracterizado pela morfologia do basidioma em forma de sino ou vaso que, em seu interior, se encontram estruturas que variam de globosas a subglobosas denominadas peridiólos, sendo, por isso, conhecidos como “ninhos de passarinho” (Brodie, 1975).

A classificação infragenérica deste grupo de fungos variou muito ao longo dos anos. *Cyathus* foi estabelecido por Haller em 1768, sendo dividido em dois grupos: *Eucyathus* e *Olla*. Em seguida, Lloyd (1906) subdividiu o grupo *Eucyathus* em dois e o *Olla* em três, totalizando cinco grupos. Na década de 70, Brodie publicou mais de 50 trabalhos e duas monografias onde foram descritas 62 espécies, sendo *Cyathus* subdividido em sete grupos: *Striatus*, *Poeppigii*, *Olla*, *Pallidus*, *Triplex*, *Gracilis* e *Stercoreus* (Brodie, 1975). Estes trabalhos são fundamentais para a identificação dos espécimes deste táxon. No entanto, por se basear unicamente em caracteres morfológicos, algumas situações problemáticas ocorrem e nem sempre é possível chegar a um consenso sobre a que espécie o exemplar analisado pertence.

Trierveiler-Pereira & Baseia (2009a) mostraram que o gênero *Cyathus* é pouco estudado no Brasil, onde só havia sido registrado nas regiões da Amazônia, Sul e Sudeste, não havendo, assim, qualquer registro do gênero para o nordeste brasileiro. De acordo com Trierveiler-Pereira & Baseia (2009b) os primeiros registros do gênero para a região nordeste foram feitos em 1948 pelo Prof Chaves Batista e colaboradores para o estado de Pernambuco. Atualmente, temos o registro de 14 espécies de *Cyathus* para o país (Trierveiler-Pereira & Baseia, 2009a, 2009b).

---

<sup>1</sup> Trabalho em preparação para submissão para publicação como: Silva, M. A.; Barbosa, M. M. B.; Cruz, R. H. S. F.; Malosso, E.; Baseia, I. G. 2012. Revisão do Gênero *Cyathus* (Basidiomycota) em herbários do Nordeste Brasileiro. *Revista : Nova Hedwigia*.

Este trabalho teve como principal objetivo a revisão do gênero *Cyathus* nos herbários JPB, HUEFS e UFRN-Fungos, além da inclusão de novos registros no Herbário URM, incluindo no estudo todas as espécies deste gênero depositadas nos herbários do Nordeste, aumentando, assim, o conhecimento sobre sua diversidade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo dos espécimes foi realizado nos laboratórios de Taxonomia de Fungos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e na Universidade Federal de Pernambuco. Foram feitas análises macroscópicas com auxílio de lupa onde foram observadas características como tamanho e cor do basidioma, ausência ou presença da base micelial, largura e composição da boca, presença ou ausência de estipe, quando presente foi medido, tamanho do tomento. Quanto aos peridiólos, foram observados forma, cor e comprimento, características peculiares de cada um também foram descritas. As cores foram padronizadas segundo Kornerup & Wanscher (1978).

As análises microscópicas, como tamanho e cor dos basidiosporos foram feitas com auxílio do microscópio óptico. As lâminas foram montadas com KOH a 3% e realizadas medições do comprimento (L= length) e largura (W= width) do esporo, formato e espessura da parede. Com os dados, foi calculado o Qm, que é a média da razão entre o comprimento e a largura dos basidiosporos (Zhao *et al.*, 2008).

## RESULTADOS

Foram examinadas 46 exsiccatas, das quais seis eram do Herbário JPB, cinco do Herbário HUEFS e 37 do Herbário de Fungos UFRN sendo, portanto, o último o que apresenta maior número de exsiccatas desse gênero no Nordeste. Esses herbários apresentam espécimes de quatro estados do Nordeste sendo eles Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte, e um espécime da região Sul (Rio Grande do Sul). Segundo as fichas dos herbários, a maioria dos espécimes ocorre sobre madeira em decomposição, existindo ainda em folhas em decomposição, em sementes e em fezes de animais. A espécie com maior número de espécimes é *C. pedicellatus*, com sete amostras, seguida de *C. berkeleyanus*, com cinco amostras.

*Cyathus badius* Kobayasi, *Bot. Mag.*, Tokyo 51: 755 (1937)

Fig. 6

Basidioma infundibuliforme, 8-10 mm de altura, 5-8 mm de largura na boca, não expandido na parte superior e não se afunila abruptamente na base, basidiomas jovens possuem margem recurvada para dentro, preso ao substrato por um conspicuo e felpudo embasamento, de 3-5 mm de diâmetro, de mesma coloração do perídio marrom (6E4), felpudo, lanoso, não plicado. Margem minutamente fimbriada, com tomentos de 0,25 mm de comprimento, marrom (6F4). Superfície

interna lisa, laranja escuro (5B2) a cinza (5F1), podendo apresentar discretas estrias longitudinais, sem contrastar com o exterior. Peridíolos em número de 11 ou mais por basidioma, de coloração cinza escuro (1C1) a negro (6F3), 2,0-2,25 mm x 2-2,5 mm. Túnica presente, delgada, hialino amarelada, com córtex claramente simples com alguns espécimes sub-homogêneos. Esporos lisos e hialinos, ovóides a elípticos sendo alguns subglobosos, 9-11 x 13-19  $\mu\text{m}$  ( $Q_m=1,65$ ;  $L=17,06 \mu\text{m}$ ;  $W=10,33 \mu\text{m}$ ;  $n=30$ ), com paredes espessadas de 1,9-2,5  $\mu\text{m}$ .

**Habitat e distribuição:** Ocorrendo em áreas totalmente sombreadas, sobre galhos e troncos em decomposição. Encontrado no Japão (Brodie, 1975).

**Material Examinado:**

Brasil. **Rio Grande do Norte:** Município de Natal, PEDN, 18/VII/2009, Barbosa, M.M.B; Cruz, R.H.S.F. UFRN-Fungos 1318.

**Comentários:** Pertence ao grupo ‘olla’ proposto por Brodie (1975) e se caracteriza principalmente pelo perídio não hirsuto com aspecto lanoso além da coloração marrom claro. A espécie que mais se aproxima é *C. africanus* Brodie, cujos esporos são menores (8,5 x 6,5  $\mu\text{m}$ ) e distintamente apiculados. Além destas características *C. badius* não possui o peculiar padrão de tufo de pêlos encontrados em *C. africanus*. Outra espécie é *C. earlei* Lloyd que se diferencia pela presença de córtex duplo.

***Cyathus berkeleyanus* (Tul. & C. Tul.) Lloyd**, The Nidulariaceae or ‘bird’s nest fungi’: 19 (1906) Fig. 07

Basidioma campanulado a infundibuliforme, não expandido ao nível da boca, afunilando-se abruptamente na base, basidioma de 5,7-8,4 mm de altura 4,2-7,7 mm de diâmetro de boca, preso a um substrato por um embasamento pequeno e conspícuo, com a mesma coloração do exoperídio dark brown (8F4), com tomentos longos de 0,4-0,5 mm de comprimento arranjados em tufo irregulares e flexíveis, conspícuamente plicado. Margem distintamente plicada com tomentos de 0,5-0,75mm de comprimento. Superfície interna conspícuamente plicada, com brilho inexistente não contrastando com o exterior, com coloração de mahogany (brown)(8E7), não apresentando estipe. Peridíolos em número de aproximadamente 11-12 por basidioma de formato angular 1,75-2,1mm de largura e 2,26mm de comprimento, apresentando-se com cor negra. Túnica presente, fina e hialina, córtex simples. Esporos lisos e hialinos de formato elíptico, não apresentando pedicelo, 5-7,62  $\mu\text{m}$  x 8,89-13,97  $\mu\text{m}$  ( $Q_m=1,59$ ;  $L=10,54 \mu\text{m}$ ;  $W=6,73 \mu\text{m}$ ;  $n=30$ ), com paredes que variam de delgadas e levemente espessadas de 1-2,54  $\mu\text{m}$ .

**Habitat e distribuição:** Solitário em árvores em decomposição ou em floresta de galeria, a espécie em questão foi encontrada no solo. Conhecida na Jamaica (White, 1902), África do Sul (Bottomley, 1948), Índia (Brodie & Dennis, 1954), China (Liu, 1984) e México (Gómez & Pérez-Silva, 1988). No Brasil foi citado para os estados do Rio de Janeiro (Lloyd 1906, Bononi *et al.* 1984, São Paulo (Baseia & Milanez, 2001) e Paraná (de Meijer 2006).

**Material Examinado:** Brasil. **Rio Grande do Sul:** Município de Santa Maria, Morro do Elefante, 23/VI/2006, Cortez, V.G., UFRN-Fungos 1244; Brasil. **Pernambuco:** Município de Igarassu, Reserva Ecológica Charles Darwin, 04/IV/2003, Baseia, I. G., UFRN-Fungos 161.

**Comentários:** Tulasne & Tulasne (1844) consideraram esta espécie uma variedade de *C. microsporus*, porém White (1902) e Lloyd (1906) afirmaram que estas espécies eram distintas (Brodie, 1975). Macroscopicamente, *C. berkeleyanus* se parece com pequenos espécimes de *C. limbatus* ou *C. poeppigii* se diferenciando pela presença da túnica; microscopicamente, *C. berkeleyanus* apresenta basidiosporos pequenos em comparação a estas espécies (Baseia & Milanez, 2001). Este é o primeiro registro para o Nordeste Brasileiro.

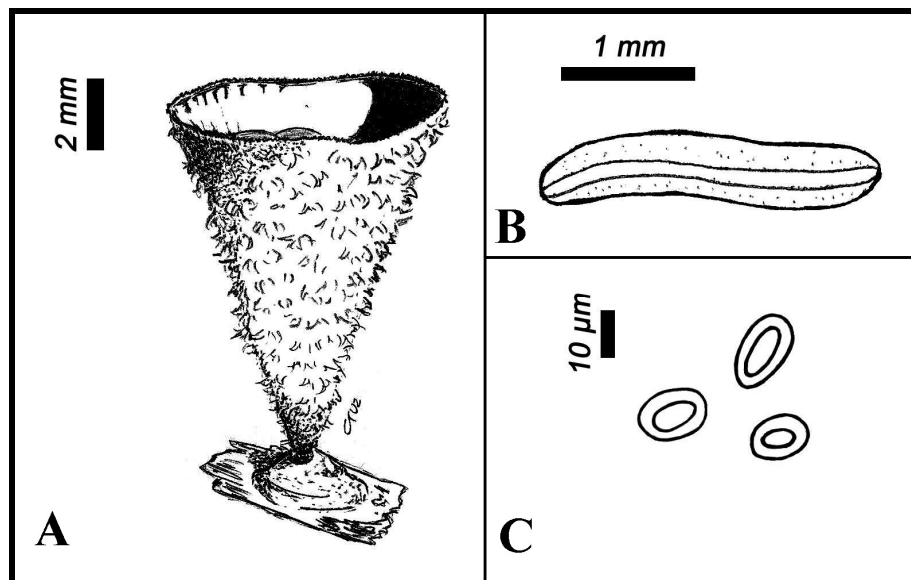


Figura 6: *Cyathus badius*. A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.

*Cyathus crassimurus* Brodie H.J. 1971 Canad. J. Bot. 49(9)

Fig.8

Basidioma infundibuliforme a raramente campanulado, 8-11 mm de altura, 4-6 mm de largura na boca, não expandido na parte superior, não afunilado na base, embasamento concolor e conspícuo, coloração do perídio dark brown, hirsuto com pelos curtos e arranjados em pequenos tufo irregulares, rígidos, exoperídio levemente estriado. Margem minutamente fimbriada, com

tomentos de 0,15mm de comprimento. Superfície interna estriada de coloração mouse grey não contrastando com o exterior. Peridiolos em número de aproximadamente 13 por basidioma, de coloração olive brown (4F3), com formato de circular a irregular medindo 1,9-1,6mm de comprimento e 1,4-1,7mm de largura. Túnica presente, espessa de cor amarelada, com córtex

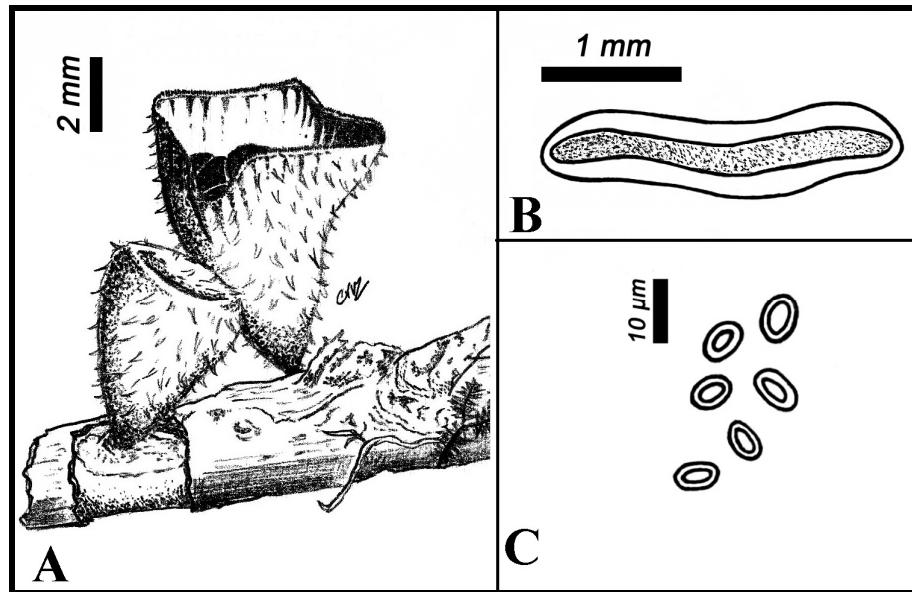


Figura 7: *Cyathus berkeleyanus*. A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos

simples. Esporos elípticos, bastante numerosos, não apresentando apículo,  $7-17\ \mu\text{m} \times 12-22\ \mu\text{m}$  ( $Q_m=1,5$ ;  $L=16,92\ \mu\text{m}$ ;  $W=9,42\ \mu\text{m}$ ;  $n=30$ ), com paredes espessadas de  $2,5-3,5\ \mu\text{m}$ .

**Habitat e distribuição:** O primeiro registro foi feito no Havaí por Brodie (1968). Mais recentemente foi relatada no trabalho de Zhou, et al (2004), tendo distribuição na China e U.S.A

**Material Examinado:** Brasil. **Pernambuco:** Município de Igarassu, Reserva Ecológica Charles Darwin, 28/V/2010, Silva, M. A; F. Wartchow, URM xxx.

**Comentários:** Esta espécie pode ser confundida com *C. pallidus* por causa da cor do basidioma amarelo pálido, no entanto, *C. pallidus* apresenta parede de peridium fina e não plicada diferente do que acontece no *C. crassimurus*. Segundo Brodie (1971) esta espécie é mais relacionada com *C. intermedius* devido a semelhança do tamanho dos esporos e a camada única do córtex, no entanto, seu trabalho com cultura destas espécies indicam que os micélios dicarióticos se apresentam diferentes. Esta é a primeira referencia para a América do Sul.

*Cyathus earlei* Lloyd, in Mycol. Writ. (7): 26 (1906)

Fig. 9

Basidioma campanulado, 6-8 mm de altura, 4-6 mm de largura na boca, não expandido na parte superior, não afunilado na base, embasamento conspícuo de 4-5mm de diâmetro, da mesma coloração do perídio violet brown (10F5), hirsuto com tomentos irregulares de 6-7mm de comprimento arranjados em pequenos tufos irregulares, rígidos, exoperídio liso. Margem minutamente fimbriada, com tomentos de 0,15mm de comprimento. Superfície interna fracamente estriada a lisa de coloração greyish brown (8E3) a greyish brown (8F2), levemente brilhante, mas não contrastando com o exterior. Peridíolos em número de aproximadamente 14 por basidioma, de coloração olive brown (4F3), com formato de circular a irregular medindo 1,7-2,2mm de comprimento e 1,5-1,9mm de largura. Túnica presente, delgada e hialina de cor amarelada, com córtex de duplo a subhomgênio. Esporos ovóides a elípticos, bastante numerosos, não apresentando apículo, 10-12,5  $\mu\text{m}$  x 14-22,5  $\mu\text{m}$  ( $Q_m=1,58$ ;  $L=18,17 \mu\text{m}$ ;  $W=11,58 \mu\text{m}$ ;  $n=30$ ), com paredes espessadas de 3-3,75  $\mu\text{m}$ .

**Habitat e distribuição:** Ocorrendo em áreas totalmente sombreadas, sobre galhos e troncos em decomposição. A amostra foi encontrada em sementes em decomposição. É uma espécie tropical e subtropical encontrada em Cuba, Porto Rico, México e Havai (Brodie, 1975).

**Material Examinado:** Brasil. **Rio Grande do Norte:** Município de Natal, PEDN, 10/VII/2004, Baseia, I.G; Lacerda, P.P.T, UFRN-Fungos 2.

**Comentários:** Lloyd entendia que *C. earlei* estava relacionado com o *C. olla*, no entanto o primeiro apresenta uma cor marrom e parede do perídio fina, com superfície interna prateada e com esporos com maiores dimensões (Brodie, 1975). O *C. earlei* apresenta um basidioma campanulado diferente do *C. olla*.

***Cyathus gracilis*** H.J. Brodie, *Can. J. Bot.* 51 (7): 1393 (1973)

Fig. 10

Basidioma infundibuliforme, 8-12 mm de altura, 7-9 mm de largura na boca, expandido na parte superior afunilando-se abruptamente na base, fortemente preso ao substrato por um firme e grande embasamento, de 4-6 mm de diâmetro, de mesma coloração do perídio, brown(6E5) a marrom escuro (6F6), hirsuto, com pêlos longos, de 0,5-1,0 mm de comprimento, arranjados em pequenos e estreitados tufos irregulares sendo alguns direcionados para baixo, rígidos, exoperídio fracamente ou não plicado. Margem minutamente fimbriada, com tomentos de 0,25 mm de comprimento, marrom (6F4). Superfície interna lisa ou fracamente estriada, de coloração gray (5C2) a dark gray (5E1), levemente brilhante, mas não contrastando com o exterior. Peridíolos em número de 10 ou mais por basidioma, de coloração gray (1F2) a dark (6F3), 2,0-2,5 mm de diâmetro. Túnica presente, delgada, hialino amarelada, com córtex distintamente duplo.

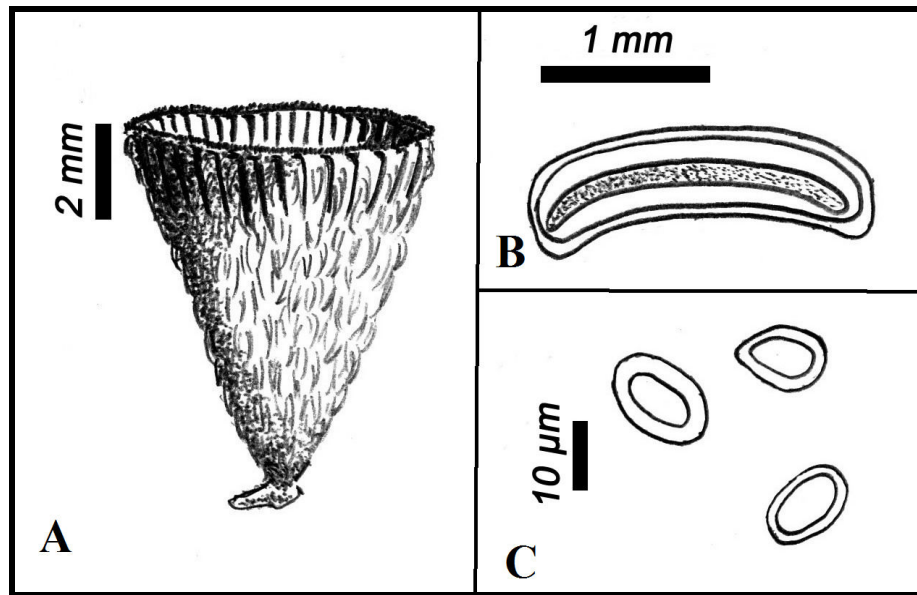


Figura 8: *Cyathus crassimurus*. A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.

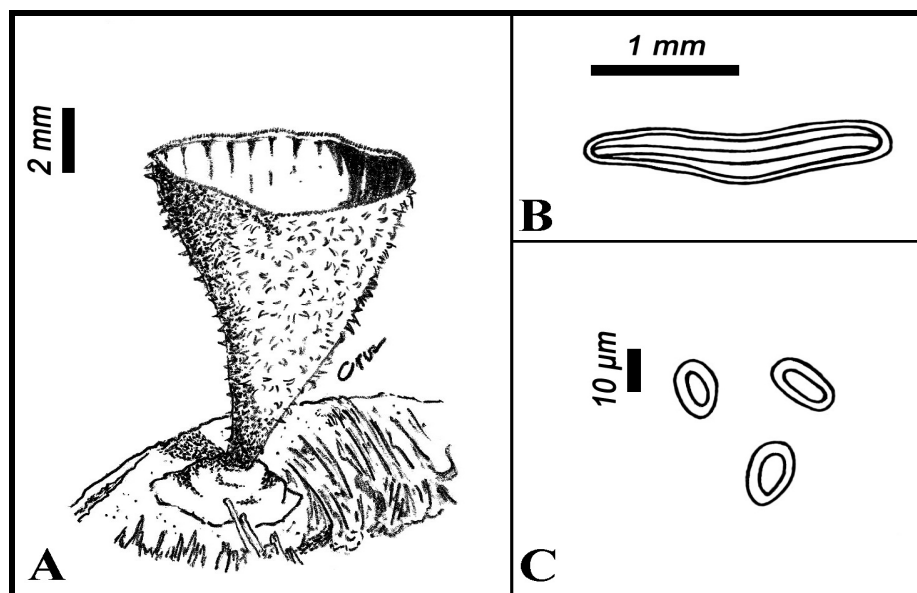


Figura 9: *Cyathus earlei*. A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.

Esporos lisos e hialinos, subglobosos a elípticos, bastante numerosos, podendo apresentar um discreto apículo, 8-12 µm x 15-19 µm ( $Q_m=1,62$ ;  $L=16,85$  µm;  $W=10,40$  µm;  $n=25$ ), com paredes espessadas de 2,2-2,86 µm.

**Habitat:** Ocorrendo em áreas totalmente sombreadas, sobre galhos e troncos em decomposição. Encontrado nas Ilhas Filipinas (Brodie, 1975).

**Material Examinado:** Brasil. **Rio Grande do Norte:** Município de Natal, PEDN, 26/VI/2009, Barbosa, MMB; Oliveira, JJS. UFRN-Fungos 1437; 19/IV/2010, Barbosa, MMB; Cruz, RHSF.

UFRN-Fungos 1438; 13/VII/2010, Barbosa, MMB; Cruz, RHSF. UFRN-Fungos 1439; 26/VI/2009, Barbosa, MMB; Oliveira, JJS. UFRN-Fungos 1440; 13/VII/2010, Barbosa, MMB; Cruz, RHSF. URM 82757; 13/VII/2010, Barbosa, MMB; Cruz, RHSF. URM 82758.

**Comentários:** Pertencente ao grupo *gracilis* (Brodie, 1975), se caracteriza principalmente pelo perídio distintamente delgado na base por vezes formando um longo pedicelo. Foi registrado unicamente para as Ilhas Filipinas representando, também, um novo registro para o continente americano. Lembra macroscopicamente a espécie *C. intermedius* (Mont.) Tul. & C. Tul. Porém esta possui córtex simples enquanto que *C. gracilis* possui um córtex duplo.

***Cyathus helenae* H. J. Brodie**, in Can. J. Bot. **44**: 1235 (1966)

Fig. 11

Basidioma infundibuliforme, 8-11mm de comprimento, 4-8mm de abertura de mesma cor do perídio brown (7E7), estriado, lanoso com pêlos longos de 0,4-0,7mm de comprimento. Margem da boca finamente fimbriada com tomentos de 0,4mm de comprimento. Superfície interna conspicuamente plicada com coloração de *dark brown* (7F5) a *greyish brown* (7F3), apresentando brilho fraco sem contrastar com o exterior. Apresenta poucos peridiolos por basidioma, aproximadamente 4, *brownish grey* (5E2), com formato circular a irregular de aproximadamente 2,0mm de tamanho e 1,7-2,0mm de largura. Túnica presente hialina e delgada, córtex distintamente simples. Esporos elípticos, lisos e hialinos não apresentando apículo, 9-14  $\mu\text{m}$  x 13,97-20,32  $\mu\text{m}$  ( $Q_m=1,60$ ;  $L=18,25 \mu\text{m}$ ;  $W=11,47 \mu\text{m}$ ;  $n=30$ ), com paredes espessadas de 2-3,81  $\mu\text{m}$ .

**Habitat e distribuição:** Cresce no solo ou troncos em decomposição. Foi coletado pela primeira vez por Brodie (1965) no Canadá.

**Material Examinado:** Brasil. **Rio Grande do Norte:** Município de Natal, PEDN, 09/VII/2004, Barbosa, MMB; Lacerda, P.P.T; Baseia, I.G., UFRN-Fungos 475;

**Comentários:** A morfologia do *C. helenae* se assemelha muito ao *C. striatus*, no entanto apresenta características como presença de plicações menores, no entanto marcadas, e a organização do tomento, diferente do *C. striatus* não apresenta formação de setas definidas se arranjando em tufos.

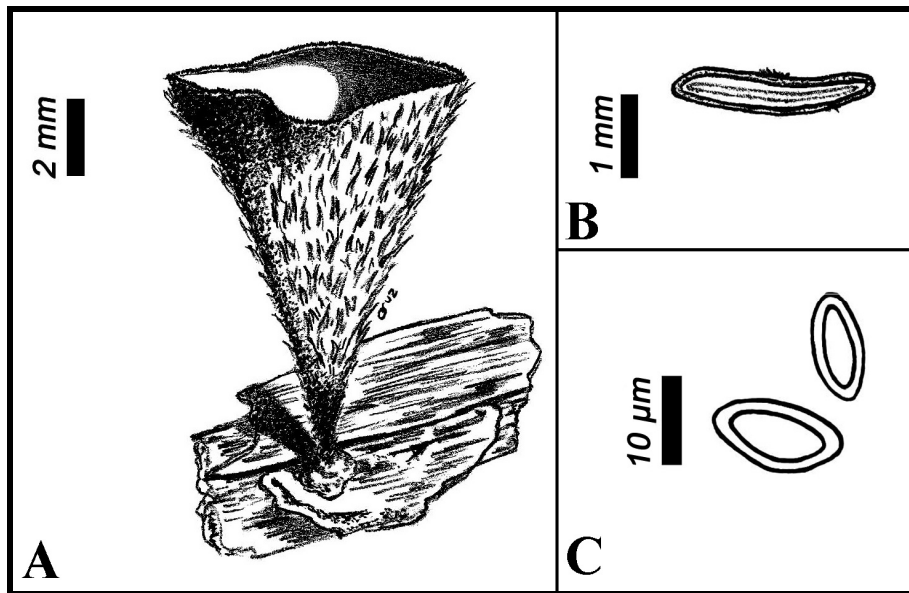


Figura 10: *Cyathus gracilis*. A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos

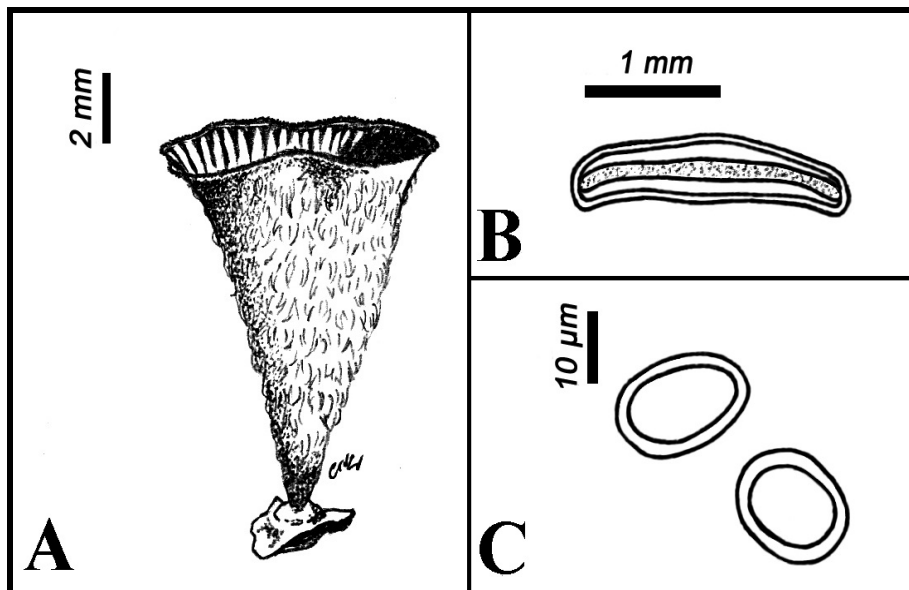


Figura 11: *Cyathus helenae*. A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.

*Cyathus intermedius* Tulasne L.-R. et al. 1844 Ann. Sci. Nat. Bot. 1

Fig. 12

Basidioma infundibuliforme, 7-8 mm de altura, 4-6mm de largura de boca, não expandido na boca, não afunilando na base, embasamento conspicuo da mesma cor do basidioma, epifragma rigido da mesma cor do basidioma. Coloração do peridio *shell pink* (8F3), hirsute, com pelos longos de 0,50-0,7 mm de comprimento arranjado em tufos irregulares e flexiveis, exoperidio liso. Margem da boca distintamente fimbriada com pelos de até 0,52 mm de comprimento. Superfície interna lisa de coloração *greyish brown* (9F3) com brilho inesistente não contrastando com o exterior. Peridiolos em número de 9 ou mais por basidioma de coloração *grey* (2F1), 1,8-1,9mm de largura e 1,9-2,3

mm de comprimento. Túnica presente com coloração amarelada, cortex simples. Esporos hialinos com formato subglogoso e apículo ausente.

**Habitat e distribuição:** Segundo Gomes & Peres (1988) esta espécie apresenta distribuição pantropical, tendo seu primeiro registro feito por Brodie (1975) na Venezuela, para o Brasil o primeiro registro é feito por Trierveiler-Pereira & Baseia (2009).

**Material examinado:** Brasil. **Paraíba:** Município Mamanguape, Reserva Guaribas, 25/V/2011, Silva, M. A.; L. H. Cavalcante, M. M. B. Barbosa; R. F. Melo. URM xxx

**Comentário:** Assemelha-se as espécies *C. olla*, *C. colensoi* e *C. hookeri*. Diferencia-se do primeiro por não apresentar dilatação na boca e tamanho de peridiolos que no *C. olla* é bem maior do que da espécie em questão. Diferencia-se do *C. colensoi* por apresentar basidioma levemente menor (6-7mm de altura e 5-6mm de largura) , além de apresentar esporos elipsoides. *C. hookeri* apresenta esporos bem menores variando de 8 x 6-8 µm além de apresentar basidiomas maiores que os do *C. intermedius*.

***Cyathus limbatus* Tul. & C. Tul., Ann. Sci. Nat., Bot., sér. 3 1: 78 (1844)**

Fig. 13

Basidioma campanulado, 8-9 mm de altura, 5-7mm de largura na boca, expandindo na boca e não afunilando na base, fortemente preso no substrato por um grande embasamento da mesma cor do perídio, no entanto, em alguns casos como os basidiomas se encontram muito próximos, não é possível medir separadamente, epifragma não visualizado, coloração do perídio *dark brown* (7F4) hirsuto, com pelos longos, de 0,5-0,7mm de comprimento arranjados em tufo irregulares, flexíveis, exoperídio fracamente plicado. Margem da boca marcadamente fimbriada com pelos de até 0,5mm de comprimento. Superfície interna finamente estriada de coloração *grey* (7F1) não contrastando com o exterior. Peridiolos em número de 8 ou mais por basidioma de coloração *olive gray* (1F2), 2,1-1,7mm de largura e 2,3-4mm de altura. Túnica não visualizada, cortex duplo. Esporos lisos e hialinos, elípticos a ovóides, não apresentando apículo, 17-20 x 9-11µm (Qm=1,61; L=17,82 µm; W=11,07 µm; n=30), com paredes espessas de 2-2,5 µm.

**Habitat e distribuição:** Ocorre em áreas sombreadas, sobre madeira ou troncos em decomposição. Amplamente distribuído em países de clima quente, ocorrendo em abundância (Brodie, 1975). No Brasil é conhecida nos estados de Amazonas (Berkeley & Cooke, 1876), São Paulo (Bononi *et al.*, 1981; Baseia & Milanez, 2001), Paraná (Meijer, 2006) e Pernambuco (Trierveiler-Pereira & Baseia, 2009).

**Material examinado:** Brasil. **Rio Grande do Norte:** Município Natal, PEDN, 07/VII/2009, Cruz, R.H.S.F; Oliveira J.J.S; Concertino, M.I.M UFRN-Fungos 1122; 19/VIII/2005, Baseia, I.G; Lacerda .P.P.T, UFRN-Fungos 1123; 10/VII/2004, Baseia, I.G; Lacerda P.P.T UFRN-Fungos 03; Brasil. **Pernambuco:** Município de Buíque, Vale do Catimbau 16/IV/2009, Oliveira, J.J.S UFRN-Fungos 1035; 04/IV/2003, UFRN- Fungos 160.

**Comentário:** Em geral essa espécie lembra muito *C. poeppigii*, mas o basidioma de *C. limbatus* é usualmente mais amplo que sua a sua altura, além de apresentar uma cor mais clara. As plicações não são tão marcadas como as do *C. poeppigii* e não se apresentam tão grosseiras (Brodie, 1975). Uma característica marcante desta espécie é possuir um conspícuo embasamento

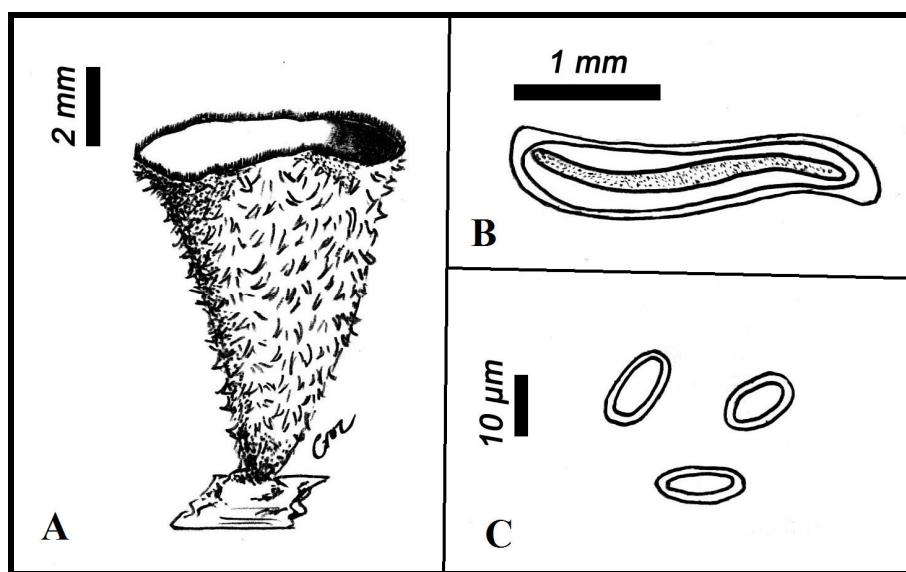


Figura 12: *Cyathus intermedius*. A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.

*Cyathus montagnei* Tul. & C. Tul. , Annis Sci. Nat., Bot., sér. 3 1: 70 (1844)

Fig. 14

Perídio infundibuliforme, 7-9 mm de altura, 5-7mm largura de boca, embasamento não visualizado, hirsuto, com pelos longos 0,5-0,8mm de comprimento, arranjado em tufo, exoperídio sutilmente marcado de cor *eye brown* (7F6) a *dark brow* (7E6). Margem da boca fimbriada, com pelos de 0,5mm de comprimento, da mesma cor da superfície do perídio. Superfície interna estriada com estrias de aproximadamente 0,5mm de comprimento, com coloração de *light brown* (7D3), não brilhante e não contrastando com o exterior. Peridiolos em número de 10 a 11 por basidioma, de coloração *greyish* (7E3) a *brown* (7F3), com largura de 1,8-2,3mm e comprimento 1,8-3 mm de comprimento no formato de irregular a circular. Túnica presente de cor amarronzada, com córtex simples a sub-homogêneo. Esporos lisos e hialinos, elípticos a ovóides, não apresentando apículo, 10-12,7 x 15,24-19,05 μm ( $Q_m=1,57$ ;  $L=17,44$  μm;  $W=11,15$  μm;  $n=30$ ), com paredes espessadas de 2-2,5 μm.

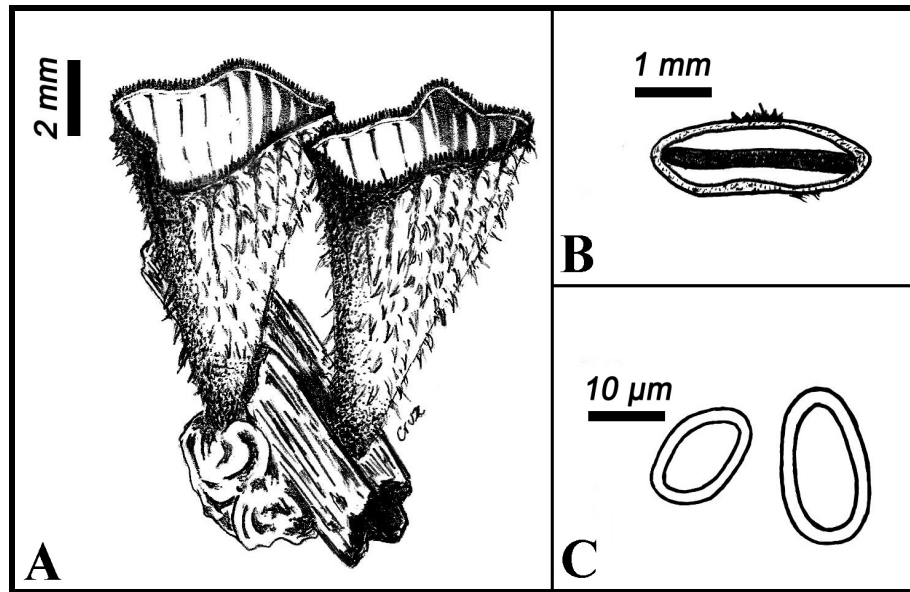


Figura 13: *Cyathus limbatus*. A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos

*Cyathus montagnei* Tul. & C. Tul. , Annis Sci. Nat., Bot., sér. 3 1: 70 (1844)

Fig. 14

**Habitat e distribuição:** Encontrado sobre galhos e troncos em decomposição. Esta espécie, por muito tempo, fora conhecida apenas no Brasil, sendo posteriormente encontrada na Índia e América Central (Brodie, 1975), Venezuela (Wolf 1949), Congo (Dissing & Lange (1962), Filipinas e Tailândia (Brodie 1954), México (Gomez & Pérez-Silva 1988), Tanzania (Calonge *et al.* (1998). No Brasil apresenta os seguintes registros: na Amazônia Hennings (1904), Lloyd (1906), no Rio Grande do Sul Rick (1961), em São Paulo Baseia & Milanez (2001) e na região Nordeste Trievailer-Pereira & Baseia (2009).

**Material Examinado:** Brasil. **Pernambuco:** Buíque, Vale do Catimbau, 30/XI/2006 Baseia, I.G., UFRN-Fungos 1112.

**Comentários:** Esta espécie se assemelha com *C. helenae* e *C. striatus*. Diferencia-se do primeiro por apresentar maiores dimensões do basidioma e uma cor mais escura e do segundo por não apresentar uma boca do tipo setosa, característica marcante da espécie. É caracterizado por apresentar exoperídio e endoperídio marcadamente plicados.

*Cyathus olivaceobrunneus* Tai & Hung, Sci. Rep. Tsing. Hua Univ., Ser. B 3(2): 161(1948) Fig. 15

Basidioma infundibuliforme, 5-9 mm de altura, 2-5 mm de largura de boca, expandido na boca e afunilando na base, fortemente preso ao substrato por um grande e firme embasamento de 3-5 mm de diâmetro, com perídio de coloração fawn (7E4) hirsuto, com tufos irregulares de textura

flexível, distintamente plicado. Margem lisa. Superfície interna conspicuamente plicada com brilho platina, não contrastando com o exterior com cor de *brownish beige* (6E2) a *brownish grey* (6F2). Peridiolos em número de 11 por basidioma, de coloração *black* (6F3), 1,0-2,0 mm de largura e 1,8-2,0mm de comprimento. Túnica presente, delgada e hialina, com córtex sub-homogêneo a duplo. Esporos não abundantes, liso, hialinos e elípticos, em alguns apresentam apículo, 9-14  $\mu\text{m}$  x 13,97-20,32  $\mu\text{m}$  ( $Q_m=1,60$ ;  $L=18,25$   $\mu\text{m}$ ;  $W=11,47$   $\mu\text{m}$ ;  $n=30$ ).

**Habitat e distribuição:** Encontrado em tronco morto ou em musgos. Foi encontrado pela primeira vez na China (Tai & Hung, 1948), depois foi descrito no México (Gomes & Pérez-Silva, 1988).

**Material Examinado:** Brasil. **Pernambuco:** Município de Buiqui, Vale do Catimbau, 17/VII/2009, Oliveira, JJS. UFRN-Fungos 1038

**Comentários:** Essa espécie se diferencia do *C. limbatus* por apresentar peridiolos de pequenas dimensões (1-2 mm de comprimento) e a forma elíptica dos esporos. Também se diferencia de *C. intermedius* por apresentar margem do perídio distintamente lisa. Segundo Brodie (1975), essa espécie pode ser sinônima de *C. poeppigii*, no entanto necessita de mais estudos que evidenciem a real importância das diferenças morfológicas, como ausência de plicação na boca e forma dos esporos, entre estas espécies. Este é o primeiro registro para o Brasil.

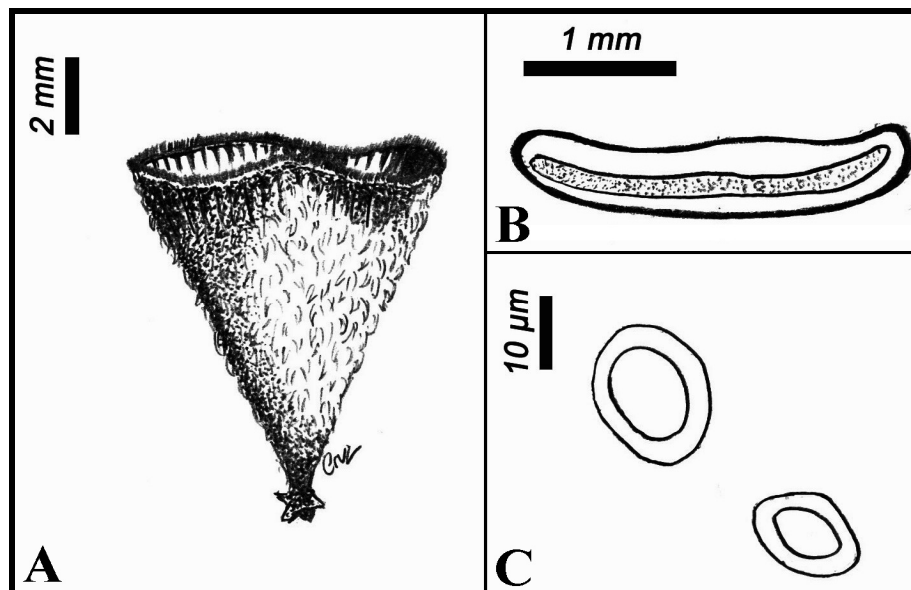


Figura 14: *Cyathus montagnei*. A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.

***Cyathus pallidus* Berk. & M. A. Curtis**, J. Linn. Soc., Bot. **10**(no. 46): 346[no. 517] (1868) [1869] Fig. 15

Basidioma campanulado de 3-6 mm de altura, 3-5 mm de largura de boca, expandido na boca e afunilando-se na base, não apresentando pedicelo, embasamento não visualizado, exoperídio de coloração somalis (7E5), hirsuto, com pelos longos de 0,5-1mm de comprimento, arranjado em tufo irregulares de textura flexível, não apresentando plicação. Margem da boca lisa. Superfície interna lisa ou fracamente estriada, de coloração reddish grey (7B2), apresentando brilho fraco não contrastando com o exterior. Peridíolos em número de aproximadamente 8-9 por basidioma, de coloração greyish brown (7F3), apresentando forma angular a irregular de 1,4-1,7mm de largura e 1,5-2,2mm de comprimento. Túnica indistinta, apresentando córtex simples. Esporos lisos e hialinos, subglobosos a elíticos e, em alguns casos ovóides, não apresentando apículo, 5-6,35 x 6,35-10,16  $\mu$ m ( $Q_m=1,46$ ;  $L=7,92 \mu$ m;  $W=5,45 \mu$ m;  $n=30$ ), com paredes delgadas de 1-1,27  $\mu$ m.

**Habitat e distribuição:** Gregário em solo ou madeira submersa. Registros da espécie são conhecidos para Porto Rico (White, 1902), América do Sul (Bottomley, 1948), Índias Ocidentais (Brodie & Dennis, 1954), Argentina (Martinez, 1954), China (Liu, 1984) e México (Gómez & Pérez-Silva, 1988). O primeiro registro para o Brasil foi feito por Lloyd (1906), sendo depois registrada para as regiões Sudeste (Baseia & Milanez, 2001) e Nordeste (Trierweiler-Pereira & Baseia, 2009).

**Material Examinado:** Brasil. **Rio Grande do Norte:** Município Baía Formosa, RPPN Mata Estrela, 24/IV/2004, Baseia, I. G. UFRN-Fungos 118.

**Comentários:** De acordo com Brodie (1975), esta espécie é muito variável em relação à cor e tamanho, variações estas também observadas em cultura. Lloyd (1906) considerou que as espécies *C. intermedius*, *C. triplex* e *C. pallidus* formavam um complexo, no entanto, Brodie (1975?) acredita que as duas últimas divergem muito da primeira formando grupos distintos.

***Cyathus pedicellatus* H. J. Brodie**, Can. J. Bot. **56** (7):732 (1976)

Fig. 16

Perídio infundibuliforme, 7-11mm de altura, 4-8mm de largura na boca, expandido na parte superior afunilando-se abruptamente na base em alguns casos formando um pedicelo que pode variar de discreto a bem visível, preso no substrato por um embasamento conspícuo de 4-7mm de diâmetro, da mesma coloração do perídio somalis (7E5), hirsuto, com pelos longos de 0,5-1,0mm de comprimento arranjado em tufo irregulares, exoperídio fracamente plicado(0,8mm). Margem marcadamente fimbriada com tomentos de aproximadamente 0,5mm de comprimento. Superfície interna fortemente estriada, de coloração greyish brown (7E3) a grey (7F1), não brilhante e não

contrastando com o exterior. Peridíolos em número de 12 ou mais por basidioma, de coloração greyish brown (8F3), 3,0-2,5mm de diâmetro. Túnica presente, delgada e amarelada, com córtex claramente duplo. Esporos lisos e hialinos elípticos, não apresentando apículo 15-24  $\mu\text{m}$  x 11,43-19,5  $\mu\text{m}$  ( $Q_m=1,68$ ;  $L=17,61$   $\mu\text{m}$ ;  $W=10,54$   $\mu\text{m}$ ;  $n=30$ ), com paredes espessadas de 1-2,54 $\mu\text{m}$ .

**Habitat e distribuição:** Ocorre em áreas totalmente sombreadas, sobre galhos e troncos em decomposição. O único registro foi feito por Brodie (1978) na Colômbia.

**Material Examinado:** Brasil. **Rio Grande do Norte:** Município de Natal, PEDN, 10/VII/2004, Baseia, I.G; Lacerda, P.P.T, UFRN-Fungos 31, UFRN-Fungos477; 10/VII/2004, Baseia, I.G; Lacerda, P.P.T; Barbosa, M.M.B, UFRN-Fungos 476; Brasil. **Pernambuco:** Município de Buíque, Vale do Catimbau, trilha Pedra da Solteira, 08/XII/2006, Gibertoni, T.B. UFRN-Fungos 406; 08/XII/2006, Gibertoni, T.B. UFRN-Fungos1290; 08/XII/2006, Gibertoni, T.B. UFRN-Fungos1292; 11/XII/2006, Gibertoni, T.B. UFRN-Fungos 397.

**Comentários:** *Cyathus pedicellatus* é uma espécie que difere das demais por apresentar seu basidioma ligado a um conspícuo embasamento através de um pedicelo de cor escura e textura firme. Pode ser confundido com *C. gracilis* por apresentar similar estrutura do basidioma (cor, tamanho e arranjo do pelos), no entanto, o *C. pedicellatus* apresenta-se fracamente estriado internamente, possui tamanho dos basidiosporos menores além de possuir uma túnica conspícua diferente do *C. gracilis* (Brodie, 1975). Esta é a primeira citação para o Brasil e segunda referencia mundial da espécie.

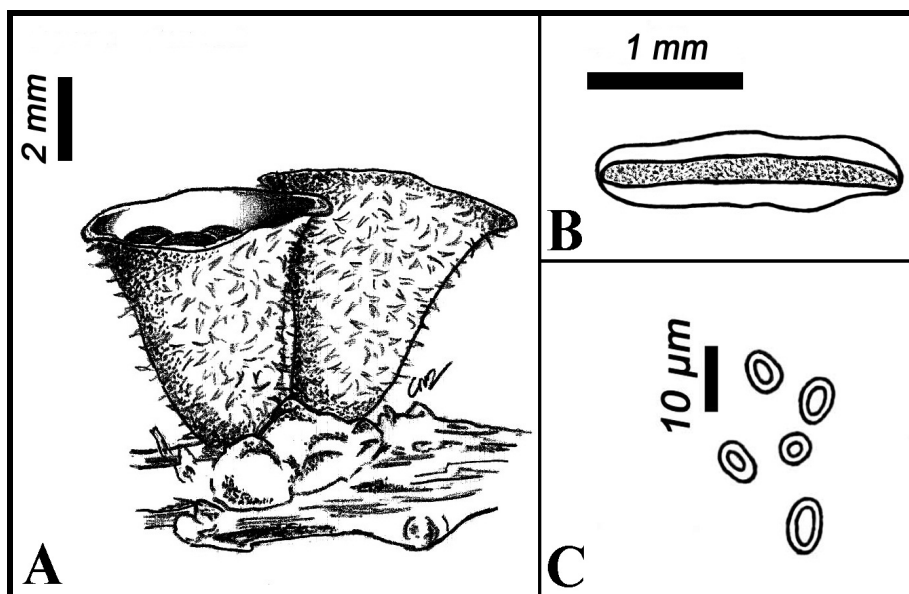


Figura 15: *Cyathus pallidus*. A. Basidioma; B. Secção do peridíolos; C. Basidiosporos.

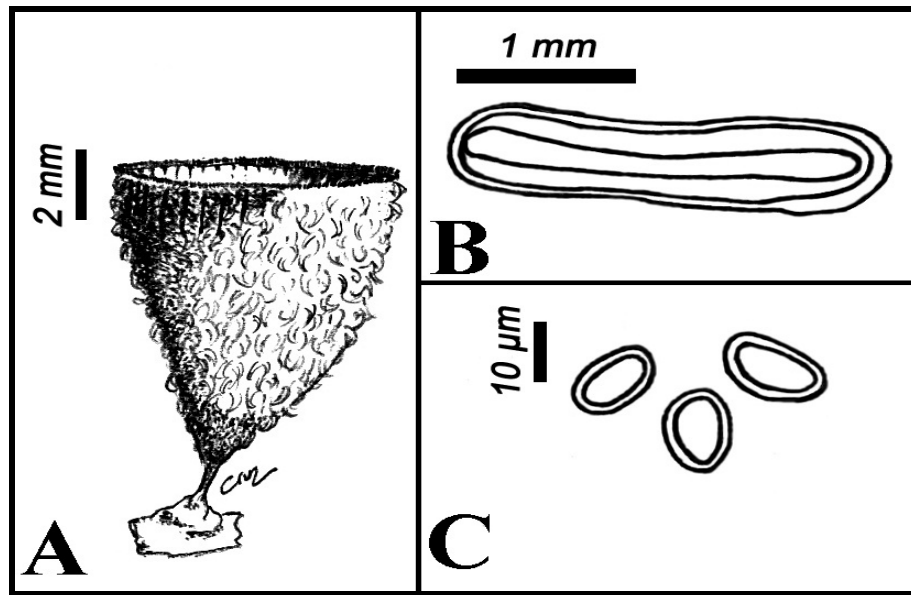


Figura 16: *Cyathus pedicellatus*. A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.

*Cyathus poeppigii* Tul. & C. Tul., Ann. Sci. Nat., Bot., sér. 3 1: 77 (1844)

Fig. 17

Perídio infundibulifome, 7-10mm de altura, 4-6mm de largura de boca, expandido na parte superior e afunilando-se na base, preso ao substrato por um embasamento da mesma coloração do perídio *brown* (5F7) a *dark brown* (5F8), hirsuto, com pelos longos de 0,8-1 mm de comprimento arranjados em tufos irregulares, o exoperídio apresenta estrias. Margem conspicuamente fimbriada com tomentos de 0,5mm de comprimento, *brown* (5F7). Superfície interna conspicuamente plicada, de coloração *brownish gray* (5F2), não contrastando com o exterior. Aproximadamente 11 peridiolos por basidioma com cor *gray* (4F1) com forma de irregular a angular medindo 1,8-2,0 mm de comprimento e 1,2-1,8 mm de largura. Túnica presente, delgada e hialina de cor amarelada, com córtex distintamente duplo. Esporos lisos e hialinos com formato elíptico a ovoide bastante numerosos não apresentando apículo, 29-34 x 19-21,µm (Qm=1,64; L=34,21; W=24,04; n=30) com paredes espaçadas de 1,5 µm.

**Habitat e distribuição:** Ocorre em áreas sombreadas, sobre madeira ou troncos em decomposição, a amostra em questão foi encontrada em madeira em decomposição de palmeiras. Uma das mais bem distribuídas espécies nos trópicos crescendo em grandes massas aglomeradas de madeira podre (Brodie, 1975). Encontrado em praticamente todos os países tropicais: Oeste da Índia, América do Sul, Ilhas Havaianas, Ásia, África, China, entre outros (Brodie, 1975). No Brasil, a espécie foi encontrada em Santa Catarina (Hennings, 1904), Rio Grande do Sul (Rick, 1961), São Paulo

(Bononi *et al.*, 1981; Baseia & Milanez, 2001), Paraná (de Meijer, 2006) e Pernambuco (Trierweiler-Pereira & Baseia, 2009b).

**Material examinado:** Brasil. **Pernambuco:** Município de Buíque, Vale do Catimbau, Goto, B.T. (UFRN-Fungos 415).

**Comentário:** Em *Cyathus poeppigii* os esporos apresentam morfologia variável e são quase sempre grandes, em algumas áreas, notadamente Índias Ocidentais, são consideravelmente menores quando comparados a outras regiões (Brodie, 1975). A amostra em questão poderia ser confundida com *C. helenae*, contudo não apresenta córtex simples e o tamanho dos esporos é menor. O mesmo acontece com a espécie de *C. limbatus*, como citado por Brodie (1975), também se distingue pelo tamanho menor dos esporos.

*Cyathus setosus* H.J. Brodie, Can. J. Bot. **45**(1): 1 (1967)

Fig. 18

Basidioma campanulado, 8-11mm de altura, 5-8mm de largura de boca, expandido na boca, em alguns casos, afunilando na base, apresenta embasamento pequeno da mesma cor do perídio, dark brown (8E4), hirsuto, com pêlos longos de 0,7-0,9mm de comprimento, arranjados em tufo irregulares, exoperídio incompiscuamente estriado. Margem finamente setosa, com tomentos de 0,7 a 0,9mm de comprimento. Superfície interna lisa de coloração grey (9E1), platina, mas não contrastando com o exterior. Peridiolos em número de 7 a 8 por basidioma, de coloração dark brown (9F4), de formato de circular a angular com tamanho de 1,5-2,5 mm de diâmetro. Túnica indistinta, com córtex distintamente duplo. Esporo lisos e hialinos, elípticos sem apículo, 5-8,9  $\mu\text{m}$  x 11,4-17,8  $\mu\text{m}$  ( $Q_m=1,66$ ;  $L=15,83 \mu\text{m}$ ;  $W=9,73 \mu\text{m}$ ;  $n=30$ ), com paredes espessadas de 1-2,5  $\mu\text{m}$ .

**Habitat e distribuição:** Encontrada no solo ou troncos em decomposição. Foi coletado pela primeira vez na Jamaica (Brodie, 1975), mais tarde foram identificadas espécies em Santa Lucia, Trindade, Guadalupe, México e Bolívia.

**Material Examinado:** Brasil. **Rio Grande do Norte:** Município de Natal, PEDN, 22/VI/2005, Silva, B.D.B.; Leite, A. G.; Baseia, I.G. UFRN-Fungos 402; Brasil. **Pernambuco:** Município Igarassu, Usina São José 08/VIII/2003, Gibertoni, T.B., UFRN-Fungos 402.

**Comentários:** Nenhuma outra espécie de *Cyathus* apresenta setas tão conspícuas que, aliado a cor escura do basidioma, tornam essa espécie única no gênero. É facilmente diferenciada do *C. triplex* por sua cor escura e seus longos pêlos do perídio, além da ausência de túnica (Brodie, 1975). Esta é a primeira referencia da espécie no Brasil.

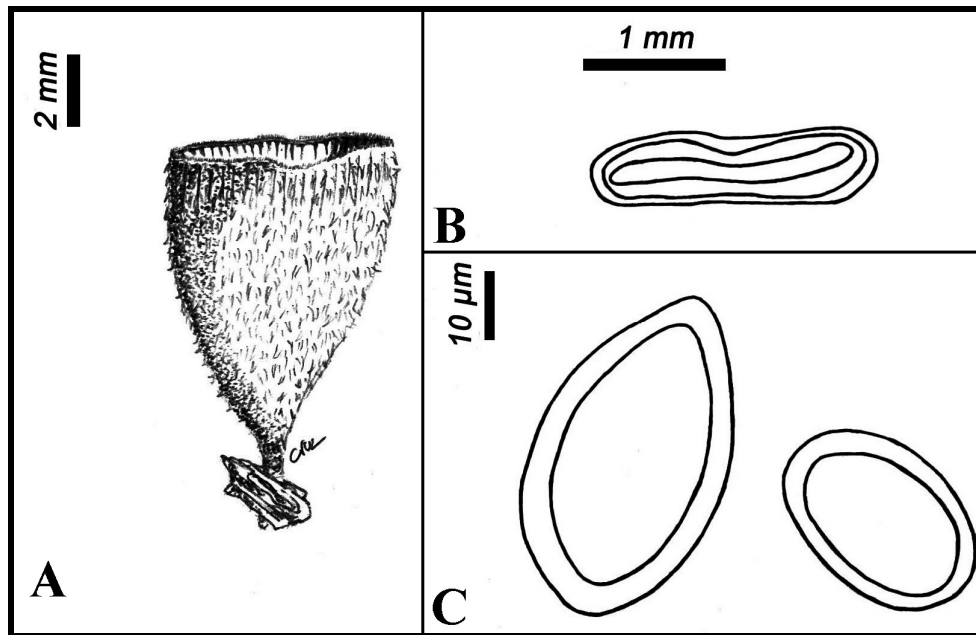


Figura 17: *Cyathus poeppigii*. A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.

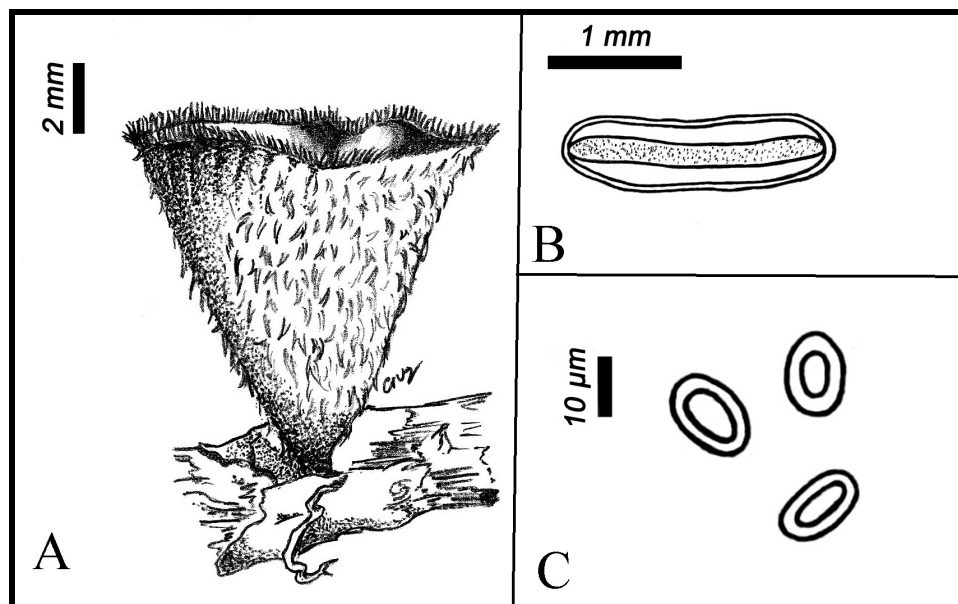


Figura 18: *Cyathus setosus*. A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.

*Cyathus striatus* (Huds.) Willd., in Fl. Berol. Prodr.: 399 (1787)

Fig. 19

Perídio infundibuliforme, 7-9mm de altura, 4-6mm de largura na boca, expandido na parte superior e afunilando-se abruptamente na base, embasamento não observado (amostra sem substrato), com perídio estriado, de cor redish brown (9F7) hirsuto com pelos longos arranjados em tufos direcionados para cima. Margem distintamente fimbriada, com tomentos de 0,48-0,5mm de comprimentos. Superfície interna estriada de coloração grey (8F1) levemente brilhante, não contrastando com o exterior. Aproximadamente 10 peridiolos por basidioma, de coloração brownish

grey (7E2), com largura de 1,8-2 mm e comprimento de 2,0-2,5mm. Túnica presente, delgada, hialina, córtex simples. Esporos se apresentam lisos e hialinos, elípticos e bem numerosos não apresentando apículo, 5-12,7  $\mu\text{m}$  x 12,7-19,5  $\mu\text{m}$  ( $Q_m=1,69$ ;  $L=16,85$   $\mu\text{m}$ ;  $W=10,33$   $\mu\text{m}$ ;  $n=30$ ), com paredes espessadas de 1-2,5  $\mu\text{m}$ .

**Habitat e distribuição:** Em grupos sobre troncos em decomposição ou em folhas em florestas de galeria. Foi encontrado na América, Europa e Ásia (Brodie, 1975). No Brasil foi registrada em Santa Catarina (Hennings, 1904), Rio Grande do Sul (Rick, 1961), São Paulo (Bononi *et al.*, 1981; Baseia & Milanez, 2001), Paraná (de Meijer, 2006), e Nordeste (Trierveiler-Pereira & Baseia, 2009).

**Material Examinado:** Brasil. **Ceará:** Município de Viçosa, 05/III/2005, Araújo, R.S., UFRN-Fungos 994; Brasil. **Paraíba:** Município de Mamanguape, Reserva Ecológica Guaribas, 17/VIII/1988, Silva, J. V. B.; Sousa, M. A., JPB 7611; Brasil. **Paraíba:** Município de Mamanguape, Reserva Ecológica Guaribas, 17/VIII/1989, Silva, J. V. B., JPB 7611.

**Comentários:** Esta espécie é caracterizada por apresentar um basidioma hirsuto com superfície interna estriada e levemente brilhante (Baseia & Milanez, 2001). Microscopicamente apresenta esporos ovóides característica importante na identificação, contudo Brodie (1975) observou que ocorre uma grande variação no tamanho dos esporos dependendo da área onde se encontram. Lloyd (1906) caracterizou duas formas da espécie: uma européia com cor escura e túnica pronunciada, e uma forma norte-americana, apresentando cor pálida e com túnica delgada.

*Cyathus triplex* Lloyd, Mycol. Writ.(7): 23 (1906)

Fig. 20

Basidioma campanulado a infundibuliforme, 6-9mm de altura, 4-6mm de boca, expandido na parte superior e afinando-se na base com pedicelo ausente, apresenta embasamento conspícuo de até 6mm de diâmetro, eye brown (7F6), hirsuto com finas mechas de até 0,3mm de comprimento, exoperídio fracamente ou não plicado. Margem claramente fimbriada. Superfície interna lisa ou fracamente estriada, com coloração dark brown (7F7), prateada brilhante, não contrastando com o exterior. Peridíolos circulares a irregulares de coloração brownish grey (8F2) com comprimento de 2,3-2,8mm e largura de 1,9-2,1mm. Túnica presentem membranosa bronze, com córtex distintamente duplo. Esporos lisos, hialinos e elípticos, sem presença de apículo, 19-25  $\mu\text{m}$  x 22,5-35  $\mu\text{m}$  ( $Q_m=1,52$ ;  $L=32,54$   $\mu\text{m}$ ;  $W=20,83$   $\mu\text{m}$ ;  $n=30$ ), com paredes espessas de 4-5  $\mu\text{m}$ .

**Habitat e distribuição:** Encontrado sobre galhos e troncos em decomposição. Foi registrado na Florida, Venezuela, Hawaii, Ilhas Filipinas e Tailândia (Brodie, 1975). No Brasil foi registrado para São Paulo (Baseia & Milanez 2001) e Nordeste (Trierweiler-Pereira & Baseia 2009).

**Material Examinado:** Brasil. **Paraíba:** Município de João Pessoa, Campus I da UFPB, 8/V/1985, Araujo, V.L.F., JPB 9329; Brasil. **Paraíba:** Município de João Pessoa, Campus I da UFPB, 8/VIII/1995, Baseia, I. G., JPB 13224; Brasil. **Paraíba:** Município de João Pessoa, Campus I da UFPB, 16/VI/1994, Oliveira, I. C., JPB 16372; Brasil. **Paraíba:** Município de João Pessoa, Campus I da UFPB, 8/VIII/1995, Baseia, I. G., JPB 13220; Brasil. **Paraíba:** Município de João Pessoa, Campus I da UFPB, 08/V/1991, Oliveira, I. C., JPB 17594.

**Comentários:** Apresentam corpos, a pesar de já está bem antigo, apresentam cor escura, com interior prateado contrastando com o interior. Brodie (1975) acredita que essa espécie possa não estar dentro do grupo *Palidus* por causa da cor e do aspecto do tomento. Outras características que tornam esta hipótese mais forte é o córtex apresentar duas camadas e os esporos serem elipsoides e apresentarem grandes dimensões.

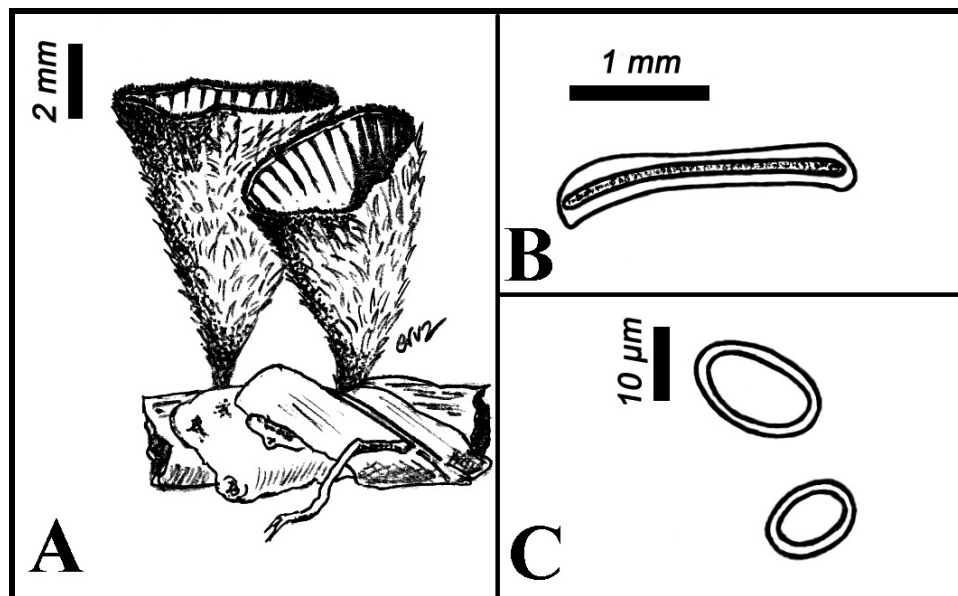


Figura 19: *Cyathus striatus*. A. Basidioma; B. Seção do peridiolos; C. Basidiosporos.

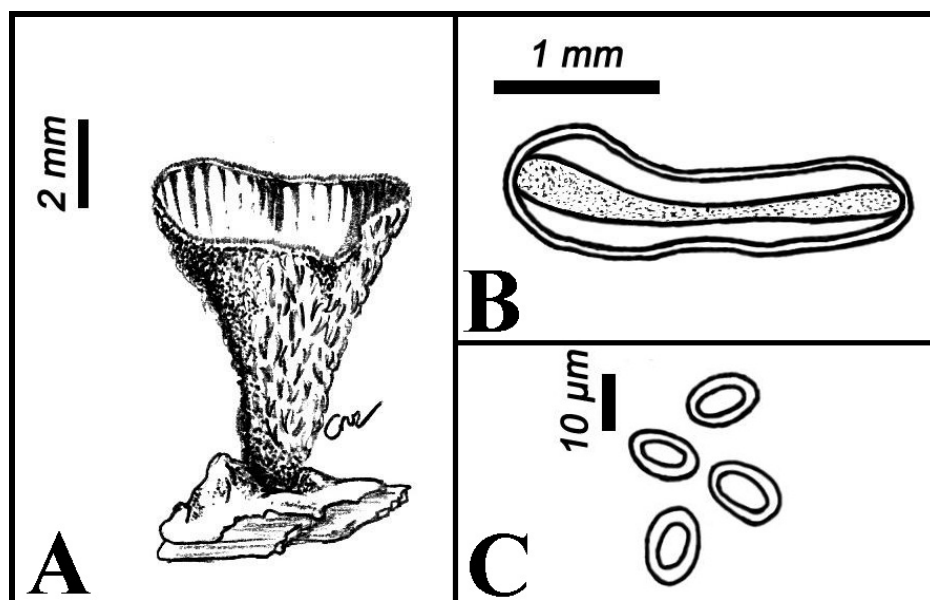


Figura 20: *Cyathus triplex*. A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.

### Considerações Finais

Registros no MycoBank e Index Fungorum mostram que houve um relativo aumento no número de espécies conhecidas de *Cyathus* no mundo, no entanto, não aparecem as citadas para o Nordeste brasileiro, apenas para as regiões Sul, Suldeste e Amazônica.

A revisão feita no herbário URM por Trierveiler & Baseia (2009) mostrou que apenas nesse herbário existiam oito espécies, o que equivale a 80% das espécies de *Cyathus* encontradas em todo o Brasil. Um fato que vale ser ressaltado é que existiam, nesse herbário, espécies depositadas desde 1945 que só foram identificadas e publicadas neste trabalho. Além das espécies do herbário URM, ainda existem mais duas espécies publicadas no estado de Bahia por Trierveiler & Bezerra (2009), e duas recentemente citadas para o estado da Paraíba (Trierveiler, 2011).

Na presente revisão dos Herbários UFRN-Fungos, UHEFS e UFPB, foram encontradas 46 exsiccatas, com um total de 16 espécies, sendo que destas, uma é segunda citação para o mundo (*C. pedicellatus*), primeira citação para America do Sul (*C. crassimurus*), duas novas referências para o Brasil (*C. olivaceus-bruneus*, *C. setosus*) e uma nova referência para o Nordeste (*C. berkeleyanus*). Isso indica que o Nordeste do Brasil possui quase 30% do número de espécies de *Cyathus* encontrada no mundo e a mesma quantidade de espécies encontradas no, mostrando que mesmo com os trabalhos já feitos ainda temos muito a fazer nesta área tanto no Brasil quanto no Nordeste.

**AGRADECIMENTOS:**

Aos professores Maria Regina de Vasconcellos Barbosa e Luciano Queiroz, curadores dos herbários JPB e HUEFS, pelo fornecimento das exsicatas. Ao professor José Luiz Bezerra e a Altielys Magnago que nos colocaram em contato com os referidos herbários. Ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior) por financiar parte das pesquisas.

## 5. FILOGENIA DAS ESPÉCIES DE *CYATHUS* (*BASIDIOMYCOTA*), COM A INCLUSÃO DE REPRESENTANTES DO NORDESTE BRASILEIRO<sup>2</sup>.

RESUMO: As relações filogenéticas de espécies de *Cyathus* com sequências disponíveis no GenBank somadas a nove espécies do gênero *Cyathus* oriundas do Nordeste foi investigada usando os métodos de Máxima Parcimônia e análise bayesiana utilizando sequências de DNA ribossomal das regiões ITS e LSU. Foram analisadas 33 amostras de três herbários: Herbário Padre Camille Torrend-URM da UFPE, o Herbário de Fungos – UFRN da UFRN e o Herbário Estadual de Feira de Santana – HUEFS. Os resultados demonstram que os novos grupos criados por Zhao (2007) se sustentam, no entanto a inclusão de sequências de espécies oriundas do Nordeste sugere dois novos clados. Os conjuntos de dados moleculares e morfológicos dão suporte para o estabelecimento de cinco novas espécies de *Cyathus* e um novo registro para o Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: herbários, morfologia, taxonomia, ITS, LSU.

### INTRODUÇÃO:

Os gêneros *Cyathus*, *Crucibulum*, *Nidula*, *Nidularia* e *Mycocalia* formam um grupo de fungos chamados de “fungos ninho de passarinho” devido à estrutura dos basidiomas apresentarem forma de sino ou vaso onde, em seu interior, se encontram estruturas lenticulares conhecidas como preidiolos. Distingue-se dos outros gêneros por apresentar um basidioma formado por três camadas, peridiolos negros além do cordão funicular complexo (Brodie, 1975). O gênero *Cyathus* através de estudos moleculares envolvendo sequências de rDNA foi alocado no clado de eucaricos (Hibbett *et al.*, 1997; Hibbett & Thorn, 2001; Moncalvo *et al.*, 2002). O trabalho feito por Mahteny (2006), que tratou de Agaricales incluiu *Cyathus striatus* e *Crucibulum leave* e concluiu que a família Nidulariaceae é um grupo irmão de Cystodermataceae.

Os trabalhos mais importantes envolvendo filogenia molecular do gênero foram realizados por Zhao e colaboradores, sendo que o primeiro foi feito através de análises de RAPD de 43 amostras de *Cyathus*, em um total de 18 taxa. Neste trabalho foram criadas duas novas espécies para o gênero (Zhao *et al.*, 2004), no entanto, esses estudos não revelaram as relações entre as espécies dentro do gênero. Zhao *et al.* (2007) reexaminou o gênero *Cyathus* com auxílio de dados morfológicos e moleculares, através do sequenciamento das regiões ITS e LSU. Como resultado, uma nova classificação infragenérica com apenas três grupos foi proposta. No entanto, este trabalho não incluiu espécimes da América do Sul, permanecendo a necessidade de mais estudos sobre este

---

<sup>2</sup> Trabalho em preparação para submissão para publicação como: Silva, M. A.; Barbosa, M. M. B.; Cruz, R. H. S. F.; Baseia, I. G.; Malosso, E. 2012. Filogenia das espécies de *Cyathus* (*Basidiomycota*), com a inclusão de Espécies do Nordeste Brasileiro.

grupo de fungos nestas áreas para que as relações filogenéticas sejam bem compreendidas ao nível mundial. Além disso, seria importante observar se ocorrem mudanças significativas nas sequências de DNA com relação a variações climáticas e espaciais. Este trabalho tem como principal objetivo determinar relações filogenéticas no gênero *Cyathus*, utilizando dados morfológicos e moleculares.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Amostras de Fungos:** Foram utilizadas 33 amostras oriundas de três diferentes herbários da região nordeste, o Herbário Padre Camille Torrend-URM da UFPE, o Herbário de Fungos – UFRN da UFRN e o Herbário Estadual de Feira de Santana – HUEFS e também oriundas de coletas feitas no estado de Pernambuco na reserva Ecológica Charles Darwin seguindo o protocolo de Muller et al., 2004. Cada espécime foi examinado morfológicamente, seguindo o protocolo modificado de Brodie (1975), antes de um fragmento ser retirado para extração.

**Extração de DNA, PCR e sequenciamento:** o DNA, tanto de material herborizado quanto de material fresco, foi extraído seguindo o protocolo de extração de Doyle & Doyle (1987), modificado por Góes-Neto et al. (2005), utilizando CTAB 2%. As reações de amplificação de fragmentos do ITS rDNA foram realizadas a partir do DNA genômico extraído dos espécimes, em termociclador (TECHNE TC-512) contendo, em tubos de 0,2 mL, um volume reacional de 25 µL com os seguintes componentes: 2,5 µL do Tampão 10X de PCR, 1,5 µL de  $MgCl_2$  a 25 mM, 0,5 µL de dNTPs a 2 mM, 1U de Taq Polimerase, 0,5 µL de cada *primer* ITS1 e ITS4 para região ITS (White et al., 1990) a 10 µM, e 5 µL do DNA alvo diluído. O programa de amplificação da região ITS envolveu: 1 ciclo inicial de desnaturação por 5 min a 94°C; seguido de 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 30 s, anelamento dos *primers* a 62°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min; além de uma extensão final de 5 min a 72°C.

Para a região LSU foram utilizados os primers LR07 e LR7 (White et al., 1990) com os seguintes reagentes para um volume final de 25 µL: 2,5 µL 10x Tampão KCl, 1,5 µL de dNTPs, 1,0 µL  $MgCl_2$ , 1,0 µL de cada primers, 0,2 µL de Taq Polimerase e aproximadamente 5 µL do DNA alvo diluído. O programa de amplificação desta região 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.

Os produtos das reações de PCR (5 µL) foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com Gel Red, sob luz UV e fotografados. Os produtos de amplificação foram purificados com kit de purificação (PureLink PCR Purification Kit, Invitrogen) e encaminhados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP.

**Alinhamento das Sequências e Análises Filogenéticas:** Os cromatogramas do sequenciamento foram avaliados e as sequências foram editadas. Após a edição, todas as sequências

foram analisadas, via BLASTn, para busca de fragmentos de DNA similares depositados no GenBank. Os acessos que apresentaram a maior porcentagem de identidade com as sequências em estudo, considerando a melhor combinação de “score” e “e-value”, foram selecionadas para as análises filogenéticas.

As análises filogenéticas foram realizadas com o programa PAUP\* 4.0B10 (Swofford, 2004) e MrBayes 3.0B4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Buscas heurísticas no conjunto de dados ITS e LSU e na combinação destes foram realizadas seguindo os seguintes métodos: máxima verossimilhança e análise bayesiana (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Huelsenbeck et al., 2001). Para máxima verossimilhança, foram limitadas 5000 árvores com 1000 repetições. Para concatenar os dados foi utilizado a rotina CONCAT do Phyutility (Smith, S. A. & Dunn, C. W., 2008). A escolha do melhor modelo de substituição tanto para máxima verossimilhança como para Bayesian foi feita com o Modeltest. Um milhão de gerações foram executadas por quatro Cadeias Markovianas e amostradas a cada 100 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.000 árvores foram descartadas como parte da fase “burn-in”, e as restantes foram usadas para calcular a probabilidade posterior. As árvores foram visualizadas no TreeView e exportadas para programas gráficos.

## RESULTADOS

Foi feita extração de 33 espécimes de *Cyathus* onde, das 19 espécies encontradas, destas nove espécies obtiveram sucesso nos processos de amplificação e sequenciamento, sendo seis espécies sequenciadas com a região ITS e oito com a região LSU. A busca por sequências similares de espécies no GenBank resultou em 14 acessos para a região ITS (Tabela 2) com identidade variando de 84 a 88% quando comparadas as nossas espécies com as sequências das espécies oriundas do nordeste, e 9 acessos com a identidade variando de 92 a 95% para a região LSU (Tabela 3).

Tabela 2: Fungos do gênero *Cyathus* oriundos de herbários, identificados por morfologia e com a sequência da região ITS comparada, a partir do BLASTn, com os dados depositados no GenBank.

| Nome no GenBank                    | Max ident<br>Sp. nov. 1 | Max ident<br>Sp. nov. 2 | Max ident<br>Sp. nov. 3 | Max ident<br>Sp. nov. 5 |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>C. africanus</i> (DQ463347.1)   | 89                      | 82                      | 88                      | 80                      |
| <i>C. anulatus</i> (DQ463351.1)    | 95                      | 83                      | 91                      | 77                      |
| <i>C. berkeleyanu</i> (DQ463355.1) | 86                      | 82                      | 87                      | 0                       |
| <i>C. colensoi</i> (DQ463344.1)    | 90                      | 82                      | 88                      | 0                       |
| <i>C. gansuensis</i> (DQ463348.1)  | 90                      | 84                      | 86                      | 0                       |
| <i>C. hookeri</i> (DQ463346.1)     | 90                      | 82                      | 88                      | 80                      |

|                                          |           |           |           |           |
|------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b><i>C. intermedius</i><sup>#</sup></b> | <b>97</b> | <b>84</b> | <b>97</b> | <b>0</b>  |
| <i>C. jiayuguanensis</i> (DQ463341.1)    | 90        | 82        | 88        | 79        |
| <i>C. olla</i> (DQ463345.1)              | 89        | 82        | 88        | 0         |
| <i>C. pallidus</i> (DQ463356.1)          | 91        | 81        | 87        | 0         |
| <b><i>C. poeppigii</i><sup>*</sup></b>   | <b>97</b> | <b>0</b>  | <b>97</b> | <b>79</b> |
| <i>C. renweii</i> (DQ463352.1)           | 95        | 82        | 91        | 0         |
| <i>C. setosus</i> (DQ463349.1)           | 92        | 82        | 89        | 78        |
| <i>C. Stercoreus</i> (EU784193.1)        | 97        | 85        | 99        | 0         |

\*Espécie depositada em herbário do Nordeste. # Espécie coletada neste trabalho.

Tabela 3: Fungos do gênero *Cyathus* oriundos de herbários, identificados por morfologia e com a sequência parcial do LSU rDNA comparada, a partir do BLASTn, com os dados depositados no GenBank.

| <b>Nome no GenBank</b>                    | <b>Max ident<br/>Sp. nov. 1</b> | <b>Max ident<br/>Sp. nov. 2</b> | <b>Max ident<br/>Sp. nov. 3</b> | <b>Max ident<br/>Sp. nov. 4</b> | <b>Max ident<br/>Sp. nov. 5</b> |
|-------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>C. africanus</i> (DQ463330.1)          | 90                              | 97                              | 86                              | 97                              | 97                              |
| <i>C. gansuensis</i> (DQ463335.1)         | 90                              | 96                              | 86                              | 97                              | 97                              |
| <i>C. griseocarpus</i> (DQ463324.1)       | 90                              | 97                              | 86                              | 98                              | 97                              |
| <i>C. helenae</i> (DQ463334.1)            | 89                              | 97                              | 86                              | 97                              | 98                              |
| <b><i>C. intermedius</i><sup>#</sup></b>  | <b>92</b>                       | <b>98</b>                       | <b>86</b>                       | <b>99</b>                       | <b>98</b>                       |
| <i>C. olla</i> (DQ463326.1)               | 90                              | 97                              | 86                              | 98                              | 97                              |
| <i>C. pallidus</i> (DQ463336.1)           | 90                              | 96                              | 86                              | 97                              | 97                              |
| <b><i>C. pedicellatus</i><sup>*</sup></b> | <b>92</b>                       | <b>99</b>                       | <b>86</b>                       | <b>97</b>                       | <b>99</b>                       |
| <b><i>C. poeppigii</i><sup>*</sup></b>    | <b>92</b>                       | <b>99</b>                       | <b>86</b>                       | <b>98</b>                       | <b>99</b>                       |
| <i>C. renweii</i> (DQ463336.1)            | 89                              | 97                              | 86                              | 97                              | 98                              |
| <i>C. setosus</i> (DQ463331.1)            | 90                              | 97                              | 86                              | 98                              | 97                              |
| <b><i>C. limbatus</i><sup>#</sup></b>     | <b>87</b>                       | <b>90</b>                       | <b>86</b>                       | <b>91</b>                       | <b>90</b>                       |

\*Espécie depositada em herbário do Nordeste. # Espécie coletada neste trabalho.

**Filogenia com base nos dados das sequências de ITS:** Seis espécies foram sequenciadas com os *primers* da região ITS que quando alinhadas as 14 do GenBank formaram um conjunto de dados com um total de 545 caracteres dos quais 225 são constantes, 142 foram parcimonias informativas e 225 foram ambíguos, sendo eliminados da análise. O melhor modelo para máxima verossimilhança e para a análise Baysiana proposto pelo Modeltest 3.7 foi o TVM+G, tendo a árvore resultante uma pontuação de desprobabilidade (-lnL) igual a 3119.4089.

A reconstrução filogenética das espécies do gênero *Cyathus* foi feita a partir de métodos de análise bayesiana e verossimilhança, que apresentaram valores de Bootstrap e Probabilidade Posterior sempre acima de 50%. Com essa construção pode-se observar que as espécies estudadas estão separadas em dois clados. O primeiro é constituído pelas espécies *Cyathus* sp nova 1 (Barbosa, 2010) e *Cyathus intermedius* e o segundo representado pelas demais espécies, sendo

ainda dividido em dois ramos distintos. Um ramo com as espécies *Cyathus* sp. nova 2 (Barbosa, , 2010) e *Cyathus* sp. nova 5 (Apêndice A) e o outro ramo com *Cyathus* sp. nova 3 (Barbosa, 2010) e *C. poeppigii* Todos os ramos possuindo alto valor estatístico, sempre acima de 98% PP.

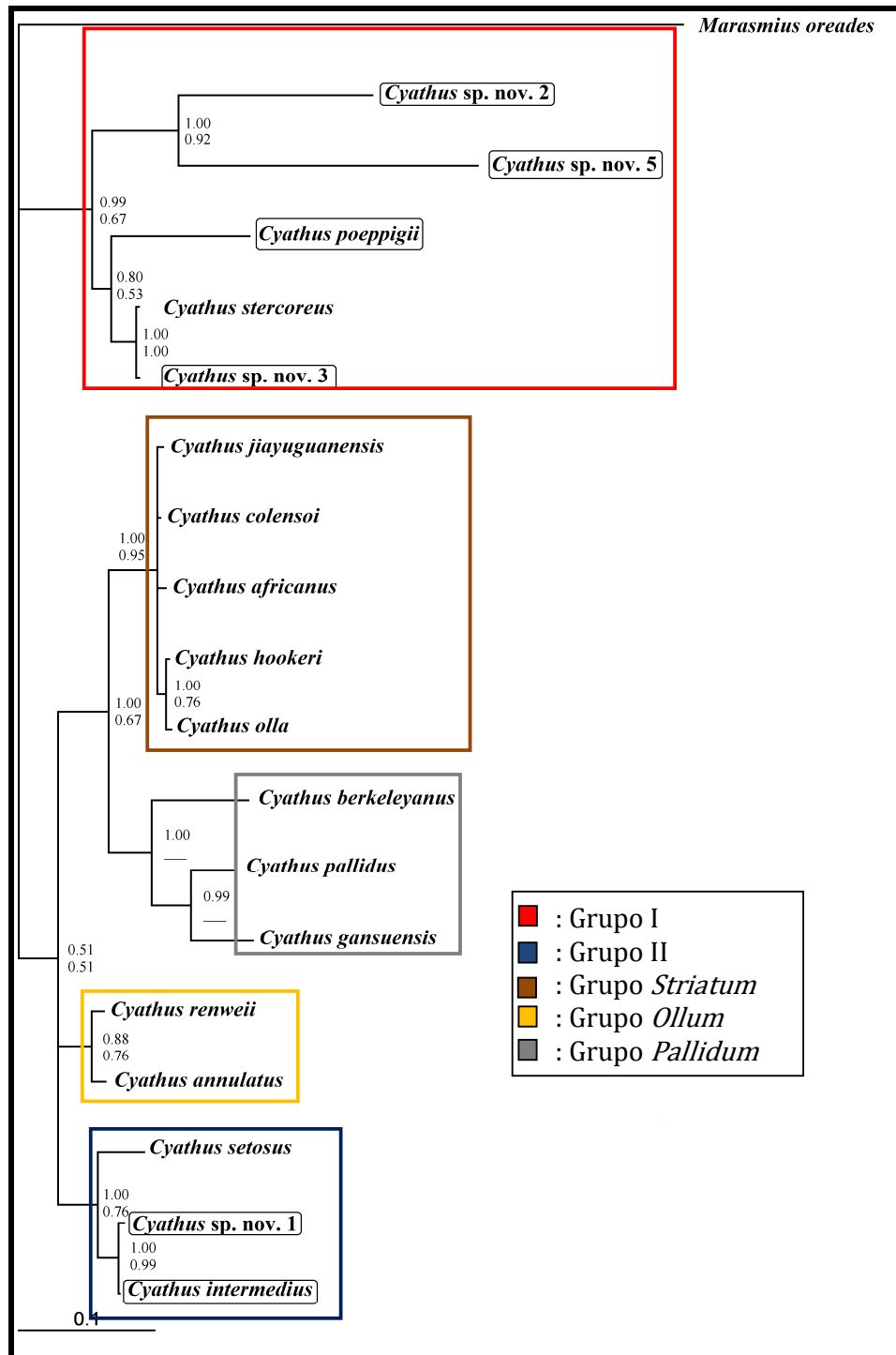


Figura 22: Reconstrução filogenética de espécies de *Cyathus* obtida a partir do alinhamento em 545 sítios relativos às regiões ITS. Os valores de Bootstrap(BS) foram obtidos a partir de 1000 repetições. Valores de Probabilidade Posterior(PP) (em %) foram gerados a partir dos métodos de análise bayesiana e somente valores acima de 50% são apresentados. Um exemplar

de *Marasmius oreades* foi usado como grupo externo. Valores de suporte da análise Bayesiana e de Bootstrap (PP/BS) são mostrados nos nós. As seis espécies sequenciadas aparecem circuladas.

**Filogenia com base nos dados das sequências de LSU:** Nove espécies diferentes tiveram a região LSU parcialmente sequenciada. Assim como na construção das árvores com sequências de ITS, também foram usadas espécies vindas do GenBank para construção da árvore. O conjunto de dados utilizados foi de 761 caracterizados quais 490 foram constantes, sendo 184 ambíguos e, portanto, eliminados da análise e apenas 87 foram parcimonia informativos. Para verossimilhança, o modelo selecionado foi GTR+G e a árvore resultante teve uma desprobabilidade de 2708.0703.

As árvores construídas a partir de sequências parciais da região LSU com espécies oriundas do Nordeste apresentaram politomia entre as espécies *Cyathus* sp. nova 1 e *Cyathus* sp. nova 3, indicando que, provavelmente, para essa região específica do DNA, estas espécies apresentam uma posição basal em relação às demais. O restante das espécies se encontram divididas em dois clados principais, sendo o primeiro formado pelas espécies *Cyathus* sp. nova 2 e as espécies *Cyathus* sp. nova 5, *C. pedicellatus* e *C. poeppigii* que formam uma politomia, indicando que para essa região do DNA estas espécies são idênticas ou que não existe variação suficiente para separá-las. O segundo clado é formado por *C. intermedius*, *Cyathus* sp. nova 4 (Barbosa, M. M. B., 2010) e *C. limbatus*. Todos os ramos possuem altos valores de PP, sempre acima de 98%.

Na topologia da Figura 21 também é observada a formação de três clados distintos, no entanto, há uma maior separação deste clado em relação ao grupo *Pallidum*, que se separou em dois subgrupos sendo que um deles, com exceção do *C. setosus*, é composto por espécies oriundas do Nordeste. Duas espécies apresentaram ramos muito longos, constituindo um grupo separado dos demais, no entanto, apresenta um baixo valor de BS (0.70). É importante ressaltar que as espécies de *C. poeppigii*, *C. pedicellatus* e *Cyathus* sp. nova 5 são similares nesta análise, no entanto, apresentam morfologia distinta, é necessário o sequenciamento de mais espécies para confirmar os resultados.

**Filogenia com base nos dados das sequências de ITS+ LSU:** Para a construção das árvores com dados combinados de ITS e LSU rDNA foi utilizado o programa CONCAT que foi usado com a finalidade de concatenar duas sequências formando uma única, assim o programa MrBayes consegue ver os dois blocos (ITS e LSU) de sequências como uma única (Figura 22) que foram usadas com o intuito de observar como as espécies deste trabalho se distribuiriam dentro dos grupos propostos por Zhao, 2007.

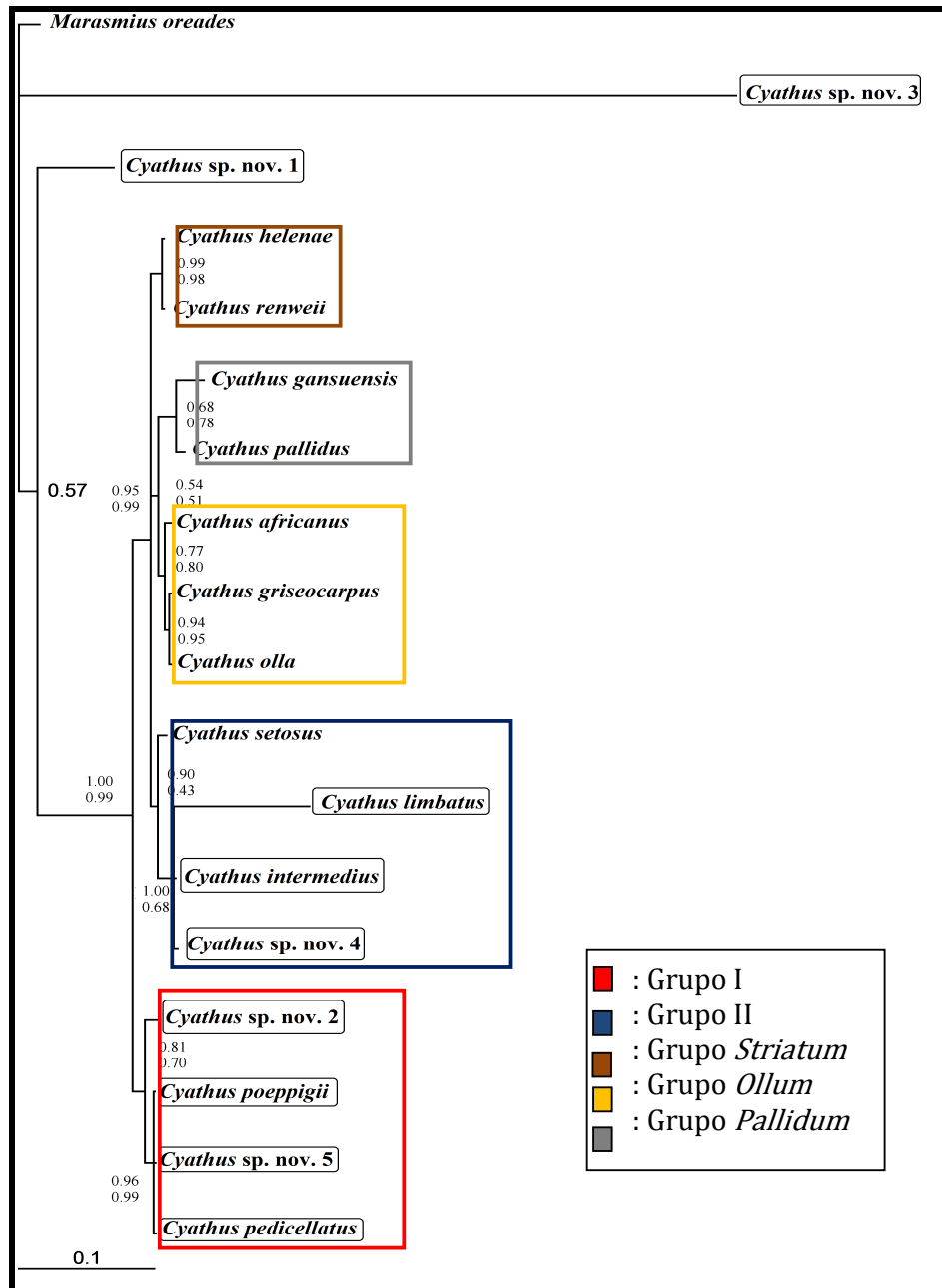


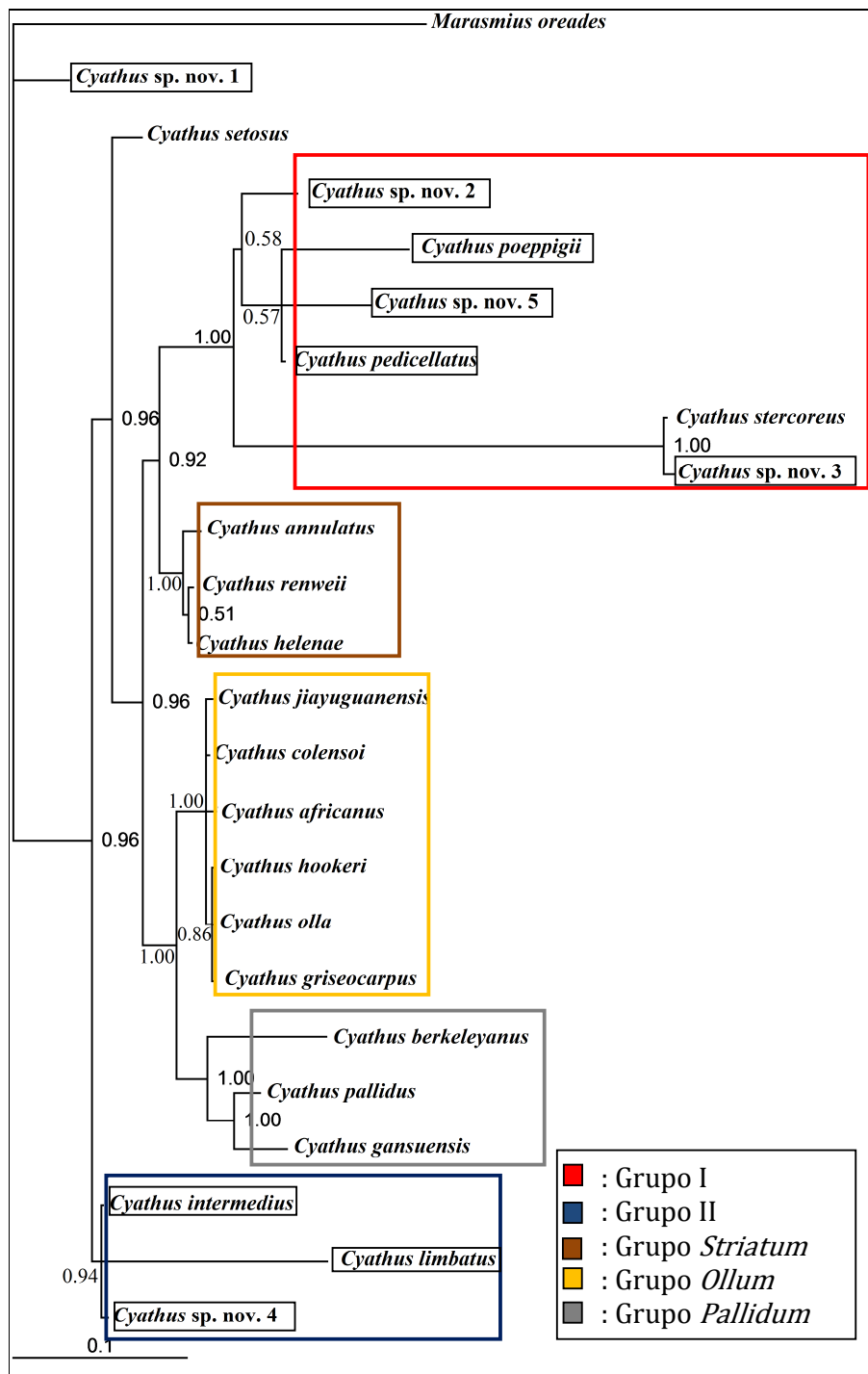
Figura 23: Reconstrução filogenética de espécies de *Cyathus* obtida a partir do alinhamento em 761 sítios relativos à região LSU. Os valores de Bootstrap(BS) foram obtidos a partir de 1000 repetições. Valores de Probabilidade Posterior(PP) (em %) foram gerados a partir dos métodos de análise bayesiana e somente valores acima de 50% são apresentados. Um exemplar de *Marasmius oreades* foi usado como grupo externo. Valores de suporte da análise Bayesiana e de Bootstrap (PP/BS) são mostrados nos nós. As nove espécies sequenciadas aparecem circuladas.

Na topologia gerada pelas sequências das espécies do Nordeste do Brasil, em combinação com as sequências do GenBank, nota-se a formação dos três grupos, como proposto por Zhao et al.

(2007), nos quais se posicionam parte das espécies estudadas, como *C. poeppigii*, *C. pedicellatus*, *Cyathus* sp. nova 3 e *Cyathus* sp. nova 5 que estão no grupo *Striatum*, no entanto, este grupo, formado pelas espécies do Nordeste, apresenta a mesma disposição das demais árvores ficando separadas das espécies já existente. E mais um grupo formado por três espécies *C. intermedius*, *C. limbatus* e *Cyathus* sp. nova 4 com suporte de 100% PP; essas espécies apresentam basidiosporos de tamanho intermediário entre 11 µm e 20 µm de comprimento e apresenta fraca ou nenhuma plicação.

Esta topologia mostra que *Cyathus* sp. nova 1, que se encontra em uma região mais basal, é caracterizada por apresentar basidiósporos menores que 15 µm sendo os únicos a apresentar apículo. A partir de *Cyathus* sp. nova 3, caracterizada por apresentar superfície interna brilhante e hábito de crescimento sobre esterco, observa-se uma ramificação mais interna e as demais espécies formam dois grupos distintos bem suportados.

O primeiro grupo, com 99% de PP, é composto por *C. intermedius*, *Cyathus* sp. nova 4 e *C. limbatus*, que são espécies que apresentam basidioporos menores que 20 µm de tamanho além de não apresentarem sua base fortemente afinada, como acontece no segundo grupo. O segundo grupo, representado pelas espécies *C. poeppigii*, *C. pedicelatus*, *Cyathus* sp. nova 2 e *Cyathus* sp. nova 5, com 100% de PP, é caracterizado por apresentar a base do basidioma constricta em alguns casos, formando um conspícuo pedicelo. *Cyathus* sp. nova 2 se diferencia das demais por apresentar córtex simples enquanto as demais apresentam córtex duplo. As demais espécies do segundo grupo são distinguíveis pela ausência (*C. poeppigii*) ou presença (*C. pedicelatus*, *C. sp* nova 5) de pedicelo.



**Figura 24:** Valores de Probabilidade Posterior (PP) (em %) foram gerados a partir dos métodos de análise bayesiana e somente valores acima de 50% são apresentados. Um exemplar de *Marasmius oreades* foi usado como grupo externo. Valores de suporte da análise Bayesiana (PP) são mostrados nos nós. As nove espécies sequenciadas aparecem circuladas.

## DISCUSSÃO

As análises deste trabalho foram feitas com duas regiões do rDNA (ITS e LSU). A região ITS é caracterizada por ser muito variável, importante característica para distinção de espécies. A região LSU é caracterizada por apresentar uma baixa taxa de variabilidade, o que não a impede de ser utilizada para separar espécies. A topologia feita com sequências da região ITS (Figura 20) mostrou que as espécies oriundas do Nordeste formam dois grupos distintos separados dos demais grupos apresentados no trabalho de Zhao (2007). O primeiro formado pelas espécies *Cyathus* sp. nova 2, *Cyathus* sp. nova 5, *C. poeppigii* e *Cyathus* sp. nova 3 que se agrupa junto a *C. stercoreus* confirmando os dados morfológicos. O *C. poeppigii* e *C. stercoreus* fazem parte do grupo *Striatum*, no entanto nestas análises são separadas das demais espécies do seu grupo se juntando ao grupo das espécies do Nordeste. O segundo grupo formado pelas espécies *Cyathus* sp. nova 1, *C. intermedius* e *C. setosus* que nos outros trabalhos aparece sem grupo definido.

A topologia formada pelo sequenciamento da região LSU assim como na região ITS formou dois grupos suportados com altos valores de PP e apresentam algumas variações. O primeiro caso é que as espécies *Cyathus* sp. nova 3 e *Cyathus* sp. nova 1 apresentaram posições basais em relação as demais e as espécies *C. poeppigii*, *C. pedicellatus* e *Cyathus* sp. nova 5 são consideradas como iguais, no entanto características morfológicas mostram que são três espécies diferentes, portanto pode-se inferir que esta região não é ideal para separar estas espécies.

A teoria de que o LSU não é a região ideal para separar as espécies *C. poeppigii*, *C. pedicellatus* e *Cyathus* sp. nova 5 foi constatada na topologia da Figura 22, que apresenta dados concatenados de ITS e LSU. Os dois grupos formados nas topologias anteriores também se repete nesta construção, no entanto separando estas espécies. As variações das posições das *Cyathus* sp. nova 1 e *Cyathus* sp. nova 3 nas topologias pode ser explicada pelo fato de que existe pouca variedade de sequências no GenBank e que estas sequências portanto não possuem uma identidade significativa com as espécies oriundas do Nordeste.

Este estudo comparava que a principal característica usada para separar os grupos foi o tamanho e a forma dos esporos, concordando com a ideia de Zhao *et al.* (2007), os esporos menores que 20 µm faziam parte do Grupo II e as espécies com esporos maiores que 20 µm estariam no Grupo I. Não foi notada a ausência ou presença de plicação como uma característica determinante na separação dos grupos, no entanto, é importante na divisão em nível de espécies. Podemos notar claramente isso no Grupo II, no qual *Cyathus* sp. nova 2 se distancia das demais tendo como critério morfológico a presença de estrias no basidioma. Também se pode concluir que a melhor região para separar espécies neste gênero é a região ITS, por ser mais variável e ainda apresentar concordância com as características morfológicas.

Apesar de ser ainda cedo para fazer afirmações concretas, devido ao baixo número de sequências disponíveis, podemos levantar a hipótese de que as espécies oriundas do Nordeste se posicionam separadas das demais. Mesmo separadas dentro dos grupos existentes, acabam por formar clados distintos ou subgrupos, todos com significância estatística e em concordância com os caracteres morfológicos. Ainda é necessária uma maior amostragem dessas espécies para que possamos comprovar a hipótese de que a variação geográfica afeta a topologia das árvores, visto que a extração de DNA de material herborizado representa uma limitação importante na obtenção dos dados a partir de PCR (Bruns *et al* , 1990).

## **AGRADECIMENTOS**

Aos curadores dos herbários JPB, HUEFS, URM e o Herbario de Fungos da UFRN, os professores Maria Regina de Vasconcellos Barbosa, Luciano Queiroz, Leonor Costa Maia e Iuri Goulart Baseia pelo fornecimento das exsicatas. Ao professor José Luiz Bezerra e a Altielys Magnago que nos colocaram em contato com alguns desses herbários. Ao professor Luis Fernando Pascholati Gusmão pelo financiamento dos sequenciamentos (Programa PPBio). Ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior) por financiar parte das pesquisas.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O gênero *Cyathus* apresenta, segundo Kirk *et al.* (2008), 45 espécies distribuídas em quase todos os continentes, sendo raro em regiões polares. A revisão feita no herbário URM por Trierveiler & Baseia (2009), mostraram que apenas nesse herbário existiam oito espécies, o que equivale a 80% das espécies de *Cyathus* encontradas em todo o Brasil. Além das espécies do herbário URM, ainda existem mais duas espécies publicadas no estado de Bahia por Trierveiler & Bezerra (2009), e duas recentemente citadas para o estado da Paraíba (Trierveiler & Baseia, 2011).

Na presente revisão dos Herbários UFRN-Fungos, UHEFS e UFPB, foram encontradas mais vinte espécies, sendo que destas, cinco registros são novos para a ciência, dois são segundas citações para o mundo (*C. pedicellatus* e *C. setosus*), além de novas referências para o Brasil (*C. olivaceus-bruneus*) e para o Nordeste (*C. berkeleianus*). Além das espécies trabalhadas nos herbários, também foram realizadas coletas nos estados da Paraíba e Pernambuco, onde foram encontradas seis espécies, sendo duas destas a primeira referência para América do Sul (*C. crassimurus* e *C. gracilis*), duas como primeiras referências para PE (*C. helenae* e *C. earlei*) e uma nova referência para PB (*C. intermedius*).

Os trabalhos filogenéticos feitos com espécies do Nordeste confirmam que algumas características apontadas por Brodie (1975, 1984), como presença ou ausência de túnica e córtex, como principais aspectos para separar os grupos infra-genéricos não são características suportadas nos clados formados. Pode-se notar que no clado que forma o Grupo 2 existem espécies com córtex simples e duplo. As amostras estudadas não mudam os clados das árvores construídas por Zhao *et al.* (2007), no entanto, formam dois novos clados, suportados por características morfológicas como forma e cor do basidioma, tamanho de esporos e substrato, que são aspectos também importantes na chave feita por Zhao *et al.* (2007). Nesta chave, porém, as características usadas para dividir os grupos dão margem a uma grande variação sendo possível uma mudança na topologia dos grupos quando inseridos novos exemplares. Outra conclusão importante é que as espécies *C. pedicellatus*, *C. poeppigii* e *C. spnova 5* não podem ser separadas com o sequenciamento da região LSU do rDNA.

Os dados do presente trabalho indicam que o Nordeste do Brasil, que apresenta 23 espécies deste gênero, possui quase 50% das espécies de *Cyathus* encontrada no mundo. Isso mostra que, apesar dos trabalhos já realizados, há muito a se fazer com relação a esse grupo de espécies no Brasil. Os dados moleculares nos mostram claramente que estas espécies ficam separadas do restante das demais espécies até agora sequenciadas, mas os estudos moleculares ainda são muito recentes, e isso se traduz na quase inexistência de sequências de fungos gasteróides da América do Sul no GenBank. As sequências obtidas das espécies desse estudo representam as primeiras oriundas da América do Sul depositadas no GenBank.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W.; Blackell, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th ed., John Wiley and Sons, Inc., Nova York.
- Ayer, W.A.; Yoshida, T.; Van Schie, D.M.J. 1978. Metabolites of Bird's Nest fungi. Part 9. Diterpenoid metabolites of *Cyathus africanus* Brodie. *Canadian Journal of Chemistry* 56: 2113-2120.
- Barbosa, M. M. B., 2011. *Fungos gasteróides em áreas de mata atlântica no estado do Rio Grande do Norte, Brasil*. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife/Pe.
- Baseia, I.G. & Milanez, A.I. 2001. *Cyathus* (Gasteromycetes) in Areas of the Brazilian Cerrado region, São Paulo State. *Mycotaxon* 80: 493-502.
- Berkeley, M.J. & Cooke, M.C. 1876. The Fungi of Brazil, including those collected by J.W.H. Trail, Esq. M.A. in 1874. *Botanical Journal of the Linnean Society* 15: 363-398.
- Berkeley, M.J. 1842. Notice of some fungi collected by C. Darwin Esq., in South America and the Islands of Pacific. *Magazine of Natural History* 9 (60): 443-448.
- Blackwell, M., Rytas, V., James, T.Y., & JTaylor, J.W., 2009. Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc.. Version 10 April 2009. <http://tolweb.org/Fungi/2377/2009.04.10> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- Bononi, V.L.R.; Guzmán, G.; Capelari, M. 1984. Basidiomicetos do Parque Estadual da Ilha do Cardoso V: Gasteromicetos. *Rickia* 11:91-97.
- Bononi, V.L.R.; Trufen, S.F.B.; Grandi, R.A.P. 1981. Fungos Macroscópicos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga depositados no herbário do Instituto de Botânica. *Rickia* 9: 37-53.
- Bottomley, A. M. 1948. Gasteromycetes of South Africa. *Bothalia* 4: 473-810.
- Brodie, H. J. 1952. Infertility between two distinct forms of *Cyathus olla*. *Micologia* 44: 413-423
- Brodie, H. J. 1956. The structure and function of the funiculus of the Nidulariaceae. *Svensk. Bot. Tidskr.* 50: 142-162.
- Brodie, H. J. 1967. New Records of Nidulariaceae From the West Indies. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 50 (3), 473-478.
- Brodie, H.J. 1975. *The Bird's Nest Fungi*. Canada, University of Toronto Press. 199p.
- Brodie, H.J. 1978. *Cyathus pedicellatus*, a new species of the Nidulariaceae from Colombia. *Canadian Journal of Botany* 56 (7): 732-735.
- Brodie, H.J. 1984. *More Bird's Nest Fungi (Nidulariaceae) – A supplement to "The Bird's Nest Fungi" (1975)*. Lejeunia Revue de Botanique, Nouvelle série n° 112.
- Bruns, D. T., White, T. J., Taylor, J. W., 1991. Fungal Molecular Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22: 525-564.
- Bruns, T. D., Szaro, T. M., Gardes, M. et al. (1998). A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Molecular Ecology*, 7, 257– 272.
- Bruns, T. D.; Fogel, R.; Taylor, J. W. 1990. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. *Mycologia*.82: 175-184.
- Calonge, F. 1998. Gasteromycetes: Lycoperdales, Nidulariales, Phallales, Sclerodermatales, Tulostomatales. *Flora Micológica Ibérica*, vol. 3, 271 pp.
- Carlile, M.J. & Watkinson, S.C. The Fungi. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom, p.588, 1994.

- Coker, W. C.; Couch, J. N. 1928. *The Gasteromycetes of the Eastern United States and Canada*. MBLWHOI Library: New York, Dover. 283 pp.
- Cunningham, C. H. 1944. *The Gasteromycetes of Australia and New Zealand*. Dunedin, 236 pp.
- Cunningham, G.H. 1924. A revision of the New Zealand Nidulariales, or "Bird's Nest Fungi". *Transaction of the New Zealand Institute* 55: 55-66.
- De Meijer, A.A.R. 2006. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian State of Paraná. *Boletim do Museu Botânico Municipal* 68:1-55.
- Dissing, H. & Lange, M. 1962. *Gasteromycetes of Congo*. *Bulletin Jardin Botanique L'etat* 32(4): 325-416.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Dring, D. M. 1973. *Gasteromycetes*. In: Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K., Sussman, A.S. (eds.). *The Fungi. An advanced treatise. Vol. IVB*. New York and London, Academic Press., pp. 451-478.
- Eckblad, F. E. 1971. *Gasteromycetes of Finnmark (Nothorn-most Norway)*. *Astarte* 4: 7-21.
- Fischer, E. 1900. In *Pflanzenfamilien*, 1 Teil, abt. 1
- Futuyma, D. J., 1992. *Biologia Evolutiva*. 2 Edição. Sociedade Brasileira de Genética. 631 pp.
- Geml, J., Davis, D.D., Geiser, D.M. 2005. Phylogenetic Analyses Reveal Deeply Divergent Species Lineages in the Genus *Sphaerobolus* (Phallales: Basidiomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 313-322.
- Góes-Neto, A.; Longuerio-Leite, C.; Guerrero, R. T. DNA Extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: perform of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas* 18(2): 19-32, 2005.
- Gómez, C.L. & Pérez-Silva, E. 1988. Especies de Nidulariales (*Gasteromycetes*) comunes em Mexico. *Revista Mexicana de Micología* 4: 161-183.
- Graur, D. & Li, W. H. 2000. *Fundamentals of molecular evolution*. 2a edição. Sinauer Press. Sunderland, Massachusetts. 481 p.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Haller, A.V. 1768. *Historia stirpium indigenarum Helvetiae inchoate*. Sumptibus Societatis typographicae.
- Hawksworth, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revised. *Mycological Research* 105 (12): 1422-1432.
- Hennings, P. 1904a. Fungi fluminenses a cl. E. Ule collecti. *Hedwigia* 43: 78-95.
- Hennings, P. 1904b. Fungi S. Paulenses III a cl. Puttemans collecti. *Hedwigia* 43: 208-209.
- Hibbett, D. S. 2002. Trends in morfphological evolution in Homobasidiomycetes inferred using maximum likelihood: a comparison of binary and multistate approaches. *Syst Biol* 269: 1963-1969.
- Hibbett, D. S., Pine, E. M., Langer, E., Langer, G., Donoghue, M. J. 1997. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Sci. USA* 94: 12002-12006.
- Hibbett, D. S., Thorn, G. R., 2000. *Basidiomycota: Homobasidiomycetes*. The Mycota VII: Systematics and evolution (D. S. McLaughlin, ed.). Springer-Verlag, Berlin.
- Hibbett, D. S.; Binder, M.; Bischoff, J. F.; Blackwell, M.; Cannon, P. F.; Eriksson, O. E.; Huhndorf, S.; James, T.; Kirk, P. M.; Lücking, R.; Thorsten Lumbsch, H.; Lutzoni, F.; Matheny, P. B.; McLaughlin, D. J.; Powell, M. J.; Redhead, S.; Schoch, C. L.; Spatafora, J. W.; Stalpers, J. A.;

- Vilgalys, R.; Aime, M. C.; Aptroot, A.; Bauer, R.; Begerow, D.; Benny, G. L.; Castlebury, L. A.; Crous, P. W.; Dai, Y.; Gams, W.; Geiser, D. M.; Griffith, G. W.; Gueidan, C.; Hawksworth, D. L.; Hestmark, G.; Hosaka, K.; Humber, R. A.; Hyde, K. D.; Ironside, J. E.; Kõljalg, U.; Cletus, P. K.; Larsson, K.; Lichtwardt, R.; Longcore, J.; Miadlikowska, J.; Miller, A.; Moncalvo, J.; Mozley-Standridge, S.; Oberwinkler, F.; Parmasto, E.; Reeb, V.; Rogers, J. D.; Roux, C.; Ryvarden, L.; Sampaio, J. P.; Untereiner, W. A.; Walker, C.; Wang, Z.; Weir, A.; Weiss, M.; White, M. M.; Winka, K.; Yao, Y.; Zhang, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research* 111: 509-547.
- Hibbett, D.S. A phylogenetic overview of the *Agaricomycotina*. *Mycologia* 98 (6): 917-925, 2006.
- Hibbett, D.S. *Ribosomal. RNA and fungal systematics*. Transactions of Mycological Society of Japan. 33: 533-556, 1992.
- Hosaka, K.; Bates, S. T.; Beever, R. E.; Castellano, M. A.; Colgan III, W.; Domínguez, L. S.; Nouhra, E. R. Geml, J.; Giachini, A. J.; Kenney, S. R.; Simpson, N. B.; Spatafora, J. W.; Trappe, J. M. 2006. Molecular phylogenetics of the gomphoid-phalloid fungi with an establishment of the new subclass Phallomycetidae and two new orders. *Mycologia* 98 (6): 949-959.
- Index Fungorum. CABI databases. Disponível em: <www.indexfungorum.org> Acesso em: 30 nov. 2011.
- Johri, B.N.; Brodie, H.J. Allbutt, A.D.; Ayer, W.A.; Taube, H. 1971. A previously unknown antibiotic complex from the fungus *Cyathus helenae*. *Biomedical and Life sciences* 27 (7): 853.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., Stalpers, J. 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, 10. ed. Wallingford, Oxon.: CAB international, p.771.
- Kornerup A. & Wanscher J. E. 1978. *Methuen Handbook of Colour*, 3 th edn., London Methuen, 243 p.
- Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Liu, B. 1984. The Gasteromycetes of China. *Beihefte Nova Hedwigia* 74: 1-235.
- Liu, Y.-J. & Zhang, K.-Q. 2004. Antimicrobial activities of selected *Cyathus* species. *Mycopathologia* 157: 185-189.
- Lloyd, C. G. 1906. *The Nidulariaceae or "Bird's-nest fungi"*. Cincinnati, *Mycological Writings*.
- Martín, G. W. 1927. Basidia and spores of Nidulariaceae. *Mycologia* 19 (5): 239-247.
- Miller, O. K. Jr. & Miller, H. H. 1988. *Gasteromycetes: Morphology and Developmental Features*. Mad River, Eureka, CA. 158 p.
- Moncalvo, J.M.; Vilgalys, R.; Redhead, S. A.; Johnson, T. Y. J.; Aime, M. C.; Hofstetter, V.; Verduin, S. J. W.; Larsoon, E.; Baroni, T. J.; Thorn, R. G.; Jacobsson, S.; Clémenton, H.; Miller Jr., O. K. 2002. One hundred and seventeen clades of eugarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 357-400.
- Mycobank, the fungal website. Disponível em: < http://www.mycobank.org> Acesso em: 30 nov. 2011.
- Nei, K.; Faloona, F. 2001. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Inc. 333p
- Nei, M. & Kumar, S. 2001. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Inc. 333 p.
- Persoon, D.C. 1801. *Synopsis Methodica Fungorum*. Gotinga, 708p.

- Rick, J.S.J. 1961. Basidiomycetes Eubasidii in Rio Grande do Sul. Brasília, Iheringia 9: 451-480.
- Saccardo, P.A. 1888. *Sylloge Fungorum*. Volume 7: 1-882.
- Schroeter, J., In: F.Cohn's 1889. *Kryplogamen Flora von Schlesien*, III.
- Swann, E. C., Taylor, J. W. 1993. Higher taxa of basidiomycetes: 18S rRNA gene perspective. *Mycologia* 85: 923-936.
- Swofford, D.L. 2003. PAUP\*. *Phylogenetic analysis using parsimony \*(and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thorn, R. G., Moncalvo, J. M., Reddy, C. A., Vilgalys, R. 2000. Phylogenetic analyses and the distribution of nematophagy support a monophyletic pleurotoid-lentinoid fungi. *Mycologia* 92: 241-252.
- Trierveiler-Pereira, L. & Baseia, I.G. 2009a. A checklist of the Brazilian gasteroid fungi (Basidiomycota). *Mycotaxon* 108: 441-444.
- Trierveiler-Pereira, L. & Baseia, I.G. 2009b. *Revision of the Herbarium URM IV. Nidulariaceae (Basidiomycota)*. Nova Hedwigia 89 (3-4): 361-369.
- Trierveiler-Pereira, L. Gomez-Silva, A.C.; Baseia, I.G. 2009. Notes on gasteroid fungi of the Brazilian Amazon rainforest. *Mycotaxon* 110: 73-80.
- Trierveiler-Pereira, L. ; Baseia, I. G. . Contribution to the knowledge of gasteroid fungi (Agaricomycetes, Basidiomycota) from Paraíba, Brazil. *Biociências (Porto Alegre)*, v. 9, p. 167-173, 2011.
- Trierveiler-Pereira, L.; Bezerra, K. M. T.; Bezerra, J. L.; Baseia, I.G. 2009. First records of Geastraceae and Nidulariaceae (Basidiomycota, Fungi) from Bahia, Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Biociências* 7 (3): 316-319.
- Tulasne L.R. & Tulasne C. 1844. Recherches sur l'organisation et le mode de frutification des champignons de la tribu des Nidulariées, suivies d'un essai monographique. *Annales des Sciences Naturelles* series 3 1: 41-107.
- White, V.S. 1902. The Nidulariaceae of North America. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 29 (5): 251-280.
- Zhao, R. L., Zhou, T. X., Wang, Y. Y., Yang, J., Soyong, K., Hyde, K. D., 2004. Application of RAPD analysis in species classification of *Cyathus*. *Proc. Of the 1st KMITL international conference on integration of science & technology for sustainable development* 2: 30-36.
- Zhao, R.L., Desjardin, D.E. Soyong, K. & Hyde, K.D. 2008. A new species of bird's nest fungi: characterization of *Cyathus subglobisporus* sp. nov. based on morphological and molecular data. *Persoonia* 21: 71-76. G
- Zhao, R.L., Jeewon, R., Desjardin, D.E. Soyong, K. & Hyde, K.D. 2007. Ribosomal DNA phylogenies of *Cyathus*: Is the current infrageneric classification appropriate? *Mycologia* 99 (3): 385-395.
- Zhou, T.X., Zhao, L.Z., Zhao, R.L. & Chen, Y.H. 2004. Bird's Nest Fungi from China. *Fungal Diversity* 17: 243-251.

## APÊNDICE

### NOVO REGISTRO DE UM *BIRD'S NEST FUNGI* PARA O MUNDO

**RESUMO:** Recentes estudos nas coleções de fungos do Gênero *Cyathus* orindas do Nordeste Brasileiro depositadas no Herbário de Fungos da UFRN resultou na descoberta de uma nova espécie. Descrições, comentários taxonômicos e desenhos do material analisado são apresentados.

### INTRODUÇÃO

O gênero *Cyathus* criado por Haller em 1768 é caracterizado por apresentar basidioma em forma de vaso ou sino, com peridiólos em seu interior. No nordeste brasileiro, o gênero ainda é muito pouco estudado. Apenas no ano de 2009, Trierveiler & Baseia, descrevem as primeiras espécies no trabalho de revisão do herbário URM e, posteriormente, no trabalho de Trierveiler & Bezerra (2009), foram feitas duas referências para o estado da Bahia, e em 2011 mais duas referências para o estado da Paraíba (Trierveiler & Baseia, 2011).

### MATERIAIS E MÉTODOS

A espécie em questão faz parte do acervo do Herbário de Fungos-UFRN. O espécime foi coletado no município de Buíque, no estado de Pernambuco, em 2007, sendo tombado como *Cyathus anulatus*. Foi identificado seguindo o protocolo modificado de Brodei (1975) tendo sido observadas as características micro e macroscópicas relevantes.

#### *Cyathus* sp. nov. 5

**Basidioma** infundibuliforme, 7-10mm de altura, 3-4mm de largura de boca, não expandido na parte superior e afunilando-se abruptamente na base, em alguns basidiomas formando um pequeno, mas conspicuo pedicelo, preso na base por um embasamento também conspicuo de cor brownish orange (7C3), com perídio hirsuto com tufo irregulares com pêlos de aproximadamente 0,61mm de comprimento, de cor pale yellow (4A3) a dark blond (5D4) apresentando estrias. Margem minutamente fimbriada, com tomentos de 0,2mm de comprimento. Superfície interna lisa ou fracamente estriada, de coloração brownish grey (8F2) brilhante mas não contrastando com o exterior. Peridiólos em número de 12 ou mais por basidioma de coloração brownish grey (8F2) com comprimento e 1,5-2,0mm e largura de 1,0-1,5mm. Túnica presente marrom escura, com córtex distintamente duplo. Esporos hialinos, elípticos a subglobosos ou globosos, não apresentando apículo, 25,4-34,29  $\mu\text{m}$  x 22-29,21  $\mu\text{m}$  ( $Q_m=1,25$ ;  $L=30,14 \mu\text{m}$ ;  $W=24,30 \mu\text{m}$ ;  $n=30$ ), com paredes delgadas de 1-2,5  $\mu\text{m}$ .

**Habitat:** Ocorrendo em áreas totalmente sombreadas. Sobre galhos e troncos em decomposição, fezes de bovino.

**Distribuição:** Nordeste.

**Material Examinado:** Brasil. Pernambuco: Município de Buíque, Vale do Catimbau, 22/VII/2007, Otonni, T.B.S, UFRN-Fungos1291; 23/VII/2007, Otonni, T.B.S UFRN-Fungos 948; 08/XII/2006, Gibertoni, T.B., UFRN-Fungos 406, UFRN-Fungos 1290, UFRN-Fungos 1292; 10/XII/2006, Drechsler-Santos, E.R.; Gibertoni, T.B., UFRN-Fungos 403; 11/XII/2006, Drechsler-Santos, E.R.; Gibertoni, T.B., UFRN-Fungos 404.

**Comentários:** Esta espécie é muito semelhante a *C. pedicellatus* por alguns basídomas apresentarem um pedicelo que pode ser discreto ou conspicuo, no entanto, se diferenciam pelo tamanho dos esporos sendo que o primeiro apresenta um esporo com tamanho acima de 27  $\mu\text{m}$  e o *C. pedicellatus* apresenta esporos de comprimento menor que 25  $\mu\text{m}$ . Também pode ser confundida com o *C. poeppigii* que apresenta basídioma bem parecido, esta espécie não apresenta pedicelo e a coloração do basídioma é bem mais escura. Nas análises filogenéticas feitas com estas espécies mostraram que são espécies diferentes, no entanto, estão no mesmo clado, o que pode indicar que presença e ausência de pedicelo seja uma boa característica para divisão destas espécies.

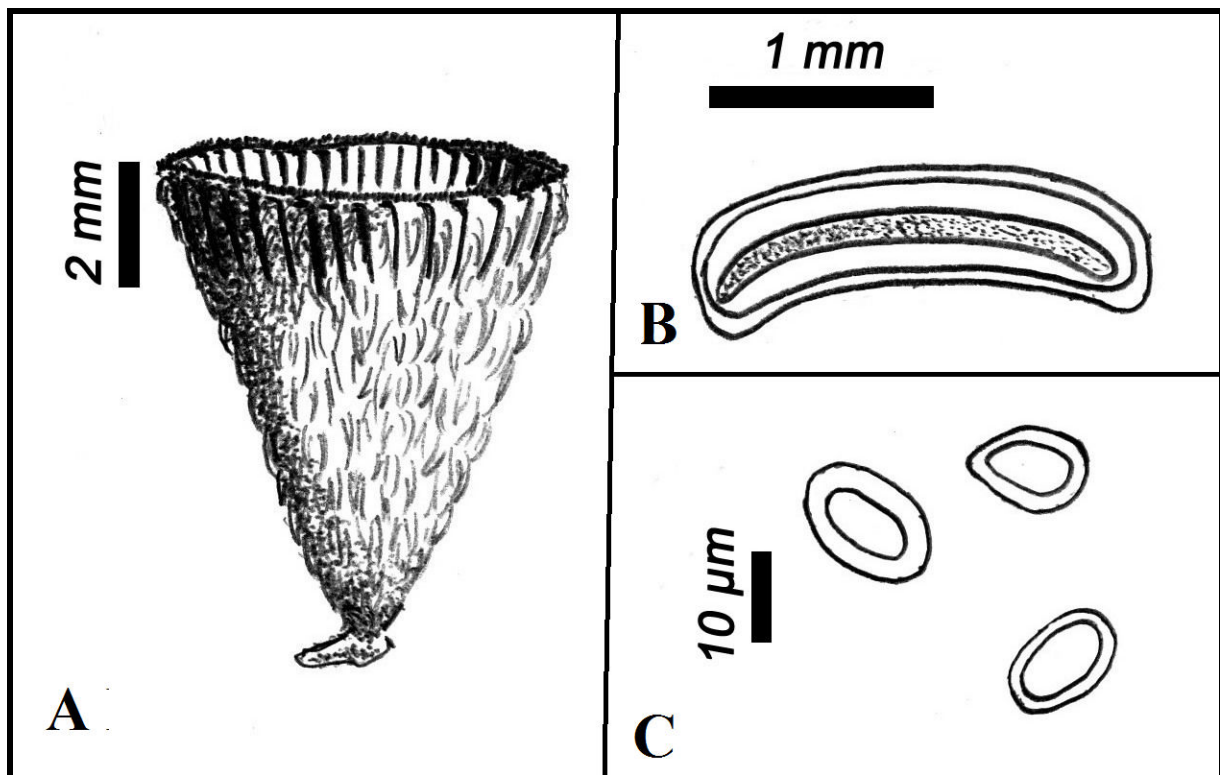


Figura 25: *Cyathus* Sp. Nov. 5A. Basidioma; B. Secção do peridiolos; C. Basidiosporos.

**AGRADECIMENTOS:**

Os autores agradecem ao Prof. Jomar Gomes Jardim, curador do Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), assim como Anileide Leite pelo repasse dos espécimes para análise.

**BIBLIOGRAFIA:**

- Brodie, H.J. 1984. *More Bird's Nest Fungi (Nidulariaceae) – A supplement to “The Bird's Nest Fungi” (1975)*. Lejeunia Revue de Botanique, Nouvelle série nº 112.
- Trierveiler-Pereira, L. & Baseia, I.G. 2009b. *Revision of the Herbarium URM IV. Nidulariaceae (Basidiomycota)*. Nova Hedwigia 89 (3-4): 361-369.
- Trierveiler-Pereira, L. ; Baseia, I. G. . Contribution to the knowledge of gasteroid fungi (Agaricomycetes, Basidiomycota) from Paraíba, Brazil. *Biociências (Porto Alegre)*, v. 9, p. 167-173, 2011.
- Trierveiler-Pereira, L.; Bezerra, K. M. T.; Bezerra, J. L.; Baseia, I.G. 2009. First records of Geastraceae and Nidulariaceae (Basidiomycota, Fungi) from Bahia, Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Biociências* 7 (3): 316-319.