



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

LEONARDO FIRMINO DA SILVA

***ENTOLOMA* SUBGÊNERO *ENTOLOMA* (ENTOLOMATACEAE,
BASIDIOMYCOTA) EM ÁREAS DE MATA ATLÂNTICA E CAATINGA NOS
ESTADOS DA PARAÍBA E PERNAMBUCO**

Recife

2024

LEONARDO FIRMINO DA SILVA

***ENTOLOMA* SUBGÊNERO *ENTOLOMA* (ENTOLOMATACEAE,
BASIDIOMYCOTA) EM ÁREAS DE MATA ATLÂNTICA E CAATINGA NOS
ESTADOS DA PARAÍBA E PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Área de concentração: Taxonomia de Fungos.

Orientador: Felipe Wartchow

Recife

2024

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Silva, Leonardo Firmino da

Entoloma subgênero Entoloma (Etolomatacea, basidiomycota) em áreas de mata e caatinga nos estados da Paraíba e Pernambuco. / Leonardo Firmino da Silva. – 2024.

63 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Felipe Wartchow.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, 2024.

Inclui referências, apêndice e anexo.

1. Macrofungo. 2. Neotrópicos. 3. Brasil. 4. Nordeste. I. Wartchow, Felipe (Orient.). II. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-174

LEONARDO FIRMINO DA SILVA

***ENTOLOMA* SUBGÊNERO *ENTOLOMA* (ENTOLOMATACEAE,
BASIDIOMYCOTA) EM ÁREAS DE MATA ATLÂNTICA E CAATINGA NOS
ESTADOS DA PARAÍBA E PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Felipe Wartchow (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba

Prof^o. Dr. Alexandre Gonçalves dos Santos e Silva Filho (Examinador Externo)
Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de São Paulo

Prof^a. Dra. Dirce Leimi Komura (Examinadora Externa)
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Maranhão - Campus São João dos Patos

Ao meu estimado e precioso filho, Lucas Leonardo. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela graça da vida e a manutenção de minha saúde com sua proteção divina. Pois em momentos difíceis sempre pude receber o seu amparo por meio de pessoas preenchidas por sua graça.

Agradeço aos meus familiares por entenderem meu jeito de ver a vida e minhas decisões, compreender minha ausência e confiar em meu potencial de realizar meus sonhos.

A todos os professores e colaboradores do Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos (PPGBF/UFPE) por todos os ensinamentos, tanto acadêmicos como de vida. Especialmente ao professor Dr. Felipe Wartchow, por sempre me orientar com paciência e dedicação, por sempre esclarecer minhas dúvidas e me ajudar com limitações financeiras e pessoais, me sinto realmente feliz em participar de um grupo de pesquisa tão animado e dedicado, desde as coletas de campo até as análises em bancada.

Aos meus colegas de laboratório que sempre me ajudaram em dúvidas comuns sobre como proceder em ambientes de pesquisa e zelar pelos materiais, em especial ao laboratório de Morfo-Taxonomia Fúngica do Departamento de Sistemática e Evolução da Universidade Federal da Paraíba (LMTF/DSE/UFPB). Ao laboratório de Basidiomycota (LabB/UFPE), com coordenação da professora Dra. Tatiana Baptista Gibertoni e seus colaboradores, que me auxiliaram desde meu curso de especialização em Micologia Geral e contribuíram significativamente com minha formação.

Aos meus “Micoamigos” feitos durante a minha trajetória na micologia desde a Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e meus colegas de turma tanto nos cursos de Mestrado e Especialização, que sempre compartilharam comigo seus sucessos e fracassos, decepções e conquistas, conversas e momentos marcantes.

A minha grande amiga Nicole Brito por me incentivar em meu sonho desde nosso primeiro contato na área da Biologia de Fungos. Seu apoio e incentivo foram sempre primordiais para seguir firme em realizar meu sonho.

Por fim e não menos importante, agradeço ao meu filho, e minha família por serem a razão de continuar persistindo em seguir o que me faz feliz, sua compreensão em minha ausência e cada “Eu te amo” que me foi dado recarregou minhas energias quando tudo parecia dar errado, eles sempre serão para mim o melhor estímulo para vencer qualquer desafio na minha vida.

“O ser que é ser transforma tudo em flores...

E para ironizar as próprias dores

Canta por entre as águas do Dilúvio!”

(*Sorriso Interior* - João da Cruz e Sousa)

RESUMO

O gênero *Entoloma* é o mais diverso entre os fungos agáricos lamelados entolomatoides, tanto no seu modo trófico como no hábito de vida, são caracterizados principalmente pela produção de esporos angulados e com esporadas de aspecto rosado a amarronzados. Estão presentes em uma variedade de habitats e biomas, mesmo antropizados, estabelecendo diversas relações ecológicas com outros seres vivos. O conhecimento acerca de sua presença e distribuição no Brasil ainda é escasso. No Nordeste brasileiro, apesar de compreender biomas de grande biodiversidade como a Mata Atlântica e a Caatinga, proporcionalmente poucos estudos relacionados a fungos são realizados. Além da escassez de registros depositados em herbários, o gênero *Entoloma* necessita de revisão e identificação adequada. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão das espécies do gênero *Entoloma* que ocorrem na região Nordeste, com ênfase aos estados da Paraíba e Pernambuco. Espécies conhecidas pela ciência ou novas foram avaliadas. Duas abordagens foram realizadas para produção de um Checklist do gênero *Entoloma* para a região Nordeste brasileira: 1- Buscas em herbários virtuais (Specieslink.net); 2- Identificação morfológica e molecular de exsiccatas e espécimes coletados nos biomas da Mata Atlântica e Caatinga. Um total de 66 depósitos do gênero estão registrados para o Nordeste brasileiro, sendo apenas 19 espécies do gênero *Entoloma* devidamente registradas e divulgadas. Após as coletas 25 exsiccatas dos dois biomas foram produzidas para futuras análises. O material genético extraído de três espécimes revelou ao menos uma nova espécie *Entoloma hygropileum* para região de Mata Atlântica do Nordeste filogeneticamente e morfológicamente próxima a espécie do continente africano *Entoloma djaense*.

Palavras-chave: Macrofungo. Neotrópicos. Brasil. Nordeste.

ABSTRACT

The genus *Entoloma* is the most diverse among the called entolomatoid lamellate agaric fungi, both in their trophic mode and in their life habits, they are characterized mainly by the production of angled spores with a pinkish to brownish appearance, they are present in a variety of habitats and biomes, even anthropized, establishing diverse ecological relationships with other living beings. Knowledge about its presence and distribution in Brazil and precisely in the Brazilian Northeast is still scarce, even though it has biomes such as the Rain Forest and the Caatinga, which have a great diversity of organisms. In addition to the scarcity of records deposited in herbaria, these require review and precise identification. The objective of this work was to review the species of the genus *Entoloma* that occur in the Northeast region, with emphasis on the states of Paraíba and Pernambuco, thus contributing to regional knowledge about the occurrence of this genus, analyzing species known to science or new ones. Searches were made in virtual herbaria (Specieslink.net), national and international journals, analysis of exsiccates and specimens collected in the Rain Forest and Caatinga biomes, to produce a checklist of species of the genus *Entoloma* identified and deposited, in addition to searching for specimens in regions of Caatinga and Rain Forest that were analyzed in the laboratory for their morphology and molecular biology, to verify new occurrences in the region. A total of 66 deposits of the genus are registered for the Brazilian Northeast, However only 19 species of the genus *Entoloma* duly registered and disclosed. After collection, 25 samples from the two biomes were produced for future analysis. The genetic material extracted from three specimens revealed at least one new species *Entoloma hygropileum* for the Northeast Rain Forest region, phylogenetically and morphologically close to the species from the African continent *Entoloma djaense*.

Keywords: Macrofungus. Neotropics. Brazil. Northeast.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Registros de depósitos em herbários virtuais do Nordeste brasileiro.	24
Figura 2 –	Resultado do sequenciamento de material genético de espécimes do gênero <i>Entoloma</i> .	28
Figura 3 –	Árvore filogenética derivada da análise Bayesiana, baseada em dados da região LSU.	31
Figura 4 –	Árvore filogenética derivada de análise bayesiana, baseada em dados das regiões ITS.	31
Figura 5 –	Basidioma de <i>Entoloma hygropileum</i> .	33
Figura 6 –	Prancha com imagens microscópicas de <i>E. hygropileum</i> (Holótipo)	34
Figura 7 –	Desenhos de <i>Entoloma hygropileum</i> (Holótipo).	35
Figura 8 –	Basidiomas <i>Entoloma</i> sp. (subgen. <i>Calliderma</i>).	36
Figura 9 –	Desenhos das estruturas microscópicas reprodutivas <i>Entoloma</i> sp. (subgen. <i>Calliderma</i>)	36
Figura 10 –	Prancha com imagens microscópicas de <i>Entoloma</i> sp. (Subgen. <i>Calliderma</i>).	37
Figura 11 –	Basidioma de <i>Entoloma bakeri</i> Dennis.	38
Figura 12 –	Desenhos das estruturas microscópicas de <i>Entoloma bakeri</i> Dennis.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Registros virtuais de espécimes do gênero <i>Entoloma</i> em herbários do Nordeste.	22
Tabela 2 –	Registros de espécies do gênero <i>Entoloma</i> para o Nordeste Brasileiro publicados em periódicos.	24
Tabela 3 –	Registro de espécimes identificados e depositados nos herbários, mas não publicados em periódicos.	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA	- Área de Proteção Permanente
BI	- Inferência Bayesiana
CEPEC	- Herbário do Centro de Pesquisas do Cacau
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DSE	- Departamento de Sistemática e Evolução
ExoSAP-IT	- Exonuclease I com Fosfatase Alcalina de Camarão Inativadas
Fig.	- Figura
FLONA	- Floresta Nacional
FTA	- Fita
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INPA	- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
ITS	- Espaço Interno Transcrito Ribossomal
IUCN	- União Internacional para a Conservação da Natureza
JPB	- Herbário Lauro Pires Xavier
LMTF	- Laboratório de Morfo-taxonomia Fúngica
LSU	- Maior Subunidade Ribossomal
NCBI	- National Center for Biotechnology Information
MV	- Máxima Verossimilhança
MP	- Máxima Parcimônia
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
ReBio	- Reserva Biológica
RPPN	- Reserva Particular do Patrimônio Nacional
RVS	- Refúgio da Vida Silvestre
UFPE	- Universidade Federal de Pernambuco
UFPB	- Universidade Federal da Paraíba
UFRN	- Universidade Federal do Rio Grande do Norte
URM	- Herbário Padre Camille Torrand
KOH	- Hidróxido de Potássio

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Celsius
TM	Trademark
®	Marca Registrada
μ	Micro
L	Litro
%	Percentil
v.	Versão

SUMÁRIO

1	Introdução	14
2	Fundamentação Teórica	15
2.1	O Gênero <i>Entoloma</i>	15
2.2	Histórico do Gênero	15
2.3	Classificação Adotada	16
2.4	A Mata Atlântica	17
2.5	A Caatinga	18
2.6	Registros de Espécies do Gênero <i>Entoloma</i> no Nordeste Brasileiro	18
3	Justificativa	19
4	Objetivos	20
4.1	Objetivos Gerais	20
4.2	Objetivos Específicos	20
5	Materiais e Métodos	20
5.1	Levantamento de Materiais Depositados em Herbários da Região Nordeste	20
5.1	Análise Materiais Herborizados e Coleta de Espécimes	21
5.2	Análises de Espécimes no Laboratório.	21
5.3	Métodos Extração e Sequenciamento	21
6	Resultados	23
6.1	Espécimes Depositados em Herbários do Nordeste Brasileiro	
6.2	<i>Check List</i> de Espécies do Gênero <i>Entoloma</i> no Nordeste Brasileiro	24
6.3	Sequências Geradas	29
6.4	Nova Espécie e Possíveis Novos Registros	30
6.5	Ilustrações e Pranchas Elaboradas.	34
7	Discussão	39
8	Considerações Finais	41
9	Referências	42
	Apêndice A – Artigo Submetido	46
	Anexo A – Protocolo de Coleta para Espécies do Gênero <i>Entoloma</i>	61
	- Michel Noordelos.	

1 Introdução

Entoloma é o principal gênero da família *Entolomataceae* e atualmente possui mais de 2000 espécies descritas (Noordeloos *et al.* 2018) e presentes em uma diversidade de habitats (Co-David *et al.* 2009; Morozova *et al.* 2014). Somente em uma pesquisa atual no site IndexFungorum (<https://www.indexfungorum.org/names/names.asp>), mais de 2600 nomes são registrados para o gênero.

Macroscopicamente, os basidiomas neste gênero são comumente do tipo tricolomatoide, mas também podem apresentar formas micenoide, colibioide, onfaloide, pleurotoide e gasteroides (Baroni; Matheny, 2011, Elliott *et al.* 2020), com estipe carnoso e fibroso e lamelas sinuadas (Noordeloos, 1981). Uma outra característica distintiva deste gênero é a impressão de esporos com tonalidades rosa a creme ou tons marrons. Microscopicamente, o gênero se diferencia pelo formato dos seus esporos angulares que podem ser hetero, isodiamétricas ou sub-isodiamétricos ou apresentarem aspectos rugosos ou sulcados, possuindo outros diversos formatos dentre eles poliédricos, estrelados e cubóides (Noordeloos; Gates 2012).

Representantes do gênero *Entoloma* podem ser encontrados na maioria dos biomas brasileiros, sendo presentes também nos biomas Mata Atlântica e Caatinga (Wartchow *et al.* 2011, Alves; Nascimento, 2012, Coimbra *et al.* 2013). O gênero possuía 56 espécies registradas para o território brasileiro segundo revisão bibliográfica feita por Putzke; Putzke (2000). Para o Nordeste somente sete espécies foram até então descritas, evidenciando o pouco conhecimento acerca da diversidade do gênero para a região, embora existam novos registros para a ciência como *E. wednae* e *E. murinoalbum* (Coimbra, 2013; Horak 1982) a falta de conhecimento sobre quais espécies ocorrem nestes biomas indicam uma lacuna sobre a diversidade deste gênero para o Nordeste, pois os últimos trabalhos na região datam de 2014. Desse modo, este estudo se propõe a revisar a literatura sobre as espécies registradas atualmente para o Nordeste brasileiro, auxiliando um melhor entendimento sobre a distribuição, ocorrência e diversidade deste gênero nesta região do país.

2 Fundamentação Teórica

2.1 O Gênero *Entoloma*

Entoloma (fr.) P. Kumm. é o gênero tipo de *Entolomataceae* Kotl.; Pouzar, uma família de fungos em sua maioria agaricoides e morfologicamente diversa, possuindo em torno de 1800 a 2000 espécies e distribuídas em todo o mundo com exceção do continente antártico (Noordeloos *et al.* 2018; He *et al.* 2019, Wijayawardene *et al.* 2020). As espécies do gênero são reconhecidas facilmente pela esporada rosada e basidiósporos principalmente angulares (iso- a heterodiamétricos, estrelados, cubóides, facetados ou irregulares), e estão presentes em diversos habitats, desde áreas próximas ao nível do mar até regiões montanhosas, também em ambientes antropizados ou naturais (Noordeloos; Gates, 2012).

Macroscopicamente, os basidiomas neste gênero são comumente do tipo tricolomatoide, mas também podem apresentar formas micenoide, colibioide, onfaloide, pleurotoide e gasteroides (Baroni; Matheny, 2011, Elliott *et al.* 2020), com estipe carnoso e fibroso e lamelas sinuadas (Noordeloos 1981). Uma outra característica distintiva deste gênero é a impressão de esporos com tonalidades rosa a creme ou tons marrons, podendo ser facilmente notada em campo (Karstedt, 2010; Noordeloos; Gates, 2012; Teixeira-Silva, 2014)

Microscopicamente, o gênero se diferencia dos demais pela geometria dos seus esporos que pode apresentar aspectos angulares, variando na forma e quantidade de ângulos (Noordeloos; Gates, 2012). A parede dos esporos é comumente caracterizada por apresentar projeções e/ou sulcos, como uma característica distinta entre euagáricos (Noordeloos; Gates, 2012), uma outra característica importante do grupo é a organização das hifas na superfície do píleo, apresentando padrões distintos que delimitam gêneros dentro de *Entolomataceae*, como a presença ou ausência de pigmentos, grampos de conexão em determinadas regiões dos basidiomas, pileocistídios e/ou elementos inflados na pileipelis (Largent, 1994).

2.2. Histórico do Gênero

O primeiro pesquisador a agrupar espécies de fungos lamelados e de esporada rosada foi Fries (1821), como 5 tribos da série *Hyporhodium* em *Agaricus*, sendo elas: *Leptonia*,

Nolanea, *Eccilia*, *Clitopilus* e *Mouceron*, esta última sinonimizada por Fries em *Clitopilus* (1830 *apud* Noordelos, 1992).

Em 1838 Fries com mais acurácia em sua proposta de classificação definiu as tribos como *Entoloma*, *Pluteus* e *Volvaria* dentro de *Hyporhodium*, posteriormente o micologista alemão Paul Kummer elevou as tribos a nível de gênero, e atualmente as duas últimas hoje pertencem a família Pluteaceae.

Quélet em 1886 ao perceber que existiam muitas espécies de esporada rosa e esporos anguladas apresentavam também características de transição entre as tribos definidas por Fries (1821, 1838) propondo o gênero *Rhodophyllus* para agrupá-las. Porém o termo é inválido segundo o código de nomenclatura botânica, devendo este ser o nome legítimo mais antigo dentro do mesmo nível. Singer (1949) também propôs a definição da família *Rhodophyllaceae* para agrupar fungos com esporada rosada e basidiósporos angulares tendo como gênero tipo *Rhodophyllus* conjuntamente com *Rhodocybe* R. Maire e *Clitopilus* (Fr.: Rabenh.) Kumm. Posteriormente aceitos para a família (Singer 1986, Largent 1994, Kirk *et al.* 2008) e confirmados molecularmente (Moncalvo *et al.* 2002, Matheny *et al.* 2006, Co-David *et al.* 2009).

Ainda seguindo das normas botânicas de nomenclatura *Rhodophyllaceae* e *Rhodophyllus* não poderiam ser usados como nomes científicos válidos, assim Kotlaba; Pouzar (1972) propuseram *Entolomataceae*, sendo *Entoloma* o gênero tipo para a família.

2.3 Classificação Adotada

A classificação do gênero ainda é incerta devido à ausência de dados morfológicos e moleculares de materiais originários de outros continentes, além da Europa e América do Norte, com habitats ainda pouco explorados, especialmente na América do Sul e África (Noordeloos; Gates, 2012, Morozova *et al.* 2014). Análises morfológicas tradicionais a partir de uma classificação infragenérica sugerem uma alta variação morfotípica, com espécies em posições intermediárias, provavelmente devido à grande diversidade encontrada no grupo e levando ao surgimento de vários subgêneros (Romagnesi 1974a, 1978; Noordeloos 1992, 2004), porém com subdivisões inconsistentes (Orton 1960, 1991, Largent; Benedict 1971, Horak 1973, 1980, Largent 1977, 1994).

Outros micologistas ainda preferem reconhecer que *Entoloma* trata-se de um grande grupo muito diversificado (Romagnesi 1978, Noordeloos 1981, 1992, 2004). A morfologia dos esporos vem sendo amplamente utilizada juntamente aos dados moleculares baseados em análises multigênicas para delimitação de espécies e grupos no gênero. Seguindo tais análises, outros gêneros como *Richoniella* Costantin; L. M. Dufour e *Rhodogaster* E. Horak derivados de *Entoloma* formam com este um grupo monofilético, que possui relações de grupo irmão com o clado *Clitopilus/Rhodocybe* (Co-David *et al.* 2009, Baroni; Matheny, 2011).

Este trabalho optou pela classificação determinada por Co-David *et al.* (2009), baseada na filogenia e morfologia dos esporos. Dividindo a família *Entolomataceae* em três gêneros, sendo eles: *Entoloma* (Fr.) P. Kumm., *Rhodocybella* T. J. Baroni; R. H. Petersen e *Clitopilus* (Fr. ex Rabenh.) P. Kumm. Representando *Richoniella* Costantin; L. M. Dufour e *Rhodogaster* Horak como gêneros inclusos em *Entoloma* e *Rhodocybe* Maire incluso em *Clitopilus*.

2.4 A Mata Atlântica

O Brasil é um país com alta taxa de diversidade, toda essa diversidade encontra-se em um mosaico de Biomas (Taboada *et al.* 2022), sendo a Mata Atlântica o terceiro maior bioma brasileiro abrigando muitas espécies endêmicas (Varjabedian, 2010; Cardoso, 2016). O bioma também é responsável por várias funções ecológicas sendo elas mais notáveis a regulação de mananciais hídricos, manutenção da fertilidade do solo, equilíbrio climático, além de evitar muitas vezes deslizamentos em encostas em regiões serranas, representa refúgio para diversas espécies em extinção (Varjabedian, 2010). Seu clima predominante é tropical úmido, com temperaturas que variam entre 10 a 20 ° C. O bioma é presente em vários estados brasileiros, em regiões de preservação ambiental como parques estaduais ou federais, o bioma é geralmente mais presente na região litorânea do país desde o Sul até o Nordeste, podendo ser encontrado também em fronteiras com outros países como Argentina e Paraguai (Cardoso, 2016; Santos *et al.* 2020)

A Mata Atlântica sofre extrativismo vegetal desde a época colonial, com o comércio e exportação de matéria prima inicialmente de espécies vegetais como o Pau Brasil (*Paubrasilia echinata*) o desmatamento causado pelo avanço de atividades da agricultura é o principal fator de impacto neste bioma (Santos *et al.* 2020), com a constante exploração

histórica da Flora e da Fauna, muitas espécies foram extintas ou elevaram sua categoria no risco de extinção aferido pela IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza), aumentando a necessidade para preservação das áreas restantes deste bioma e recuperação de áreas já degradadas. Visando a permanente proteção do Bioma como Unidades de Conservação, APAs e Reservas Naturais foram determinadas por órgãos públicos de diferentes esferas administrativas, fiscalizando e monitorando impactos antrópicos, visando a garantia dos benefícios oferecidos do bioma para a sociedade (Lima *et al.* 1997; Pinto, 2014).

2.5 A Caatinga

A Caatinga é um Bioma exclusivamente brasileiro, é caracterizada pelo clima semiárido abrangendo todo o Nordeste, onde estende-se até o Sudeste na região norte do estado de Minas Gerais. Possui uma precipitação média de 800mm por ano, um relevo de planícies, encostas e planaltos, com uma temperatura variável geralmente relacionada com um gradiente de altitude, possuindo uma vegetação arbustiva decíduas característica em sua maior parte, porém podendo ser encontradas florestas úmidas em planaltos (Silva *et al.* 2004).

O bioma da Caatinga possui uma grande incidência de espécies endêmicas que não ocorrem em nenhum outro lugar do mundo, com uma origem entre 18 e 11.000 anos atrás (Tabarelli *et al.* 2017). O potencial de uso destas espécies principalmente fúngicas para produção de enzimas como quitinases e amilases é promissor e representa uma riqueza genotípica neste bioma (Guimarães *et al.* 2017; Coelho *et al.* 2018). Uma das grandes ameaças deste bioma é o avanço da desertificação causada principalmente pelo desmatamento (Araújo; Sousa, 2011; Campos *et al.* 2015). Com a constante degradação e a iminente projeção do aumento de 4°C para o século, infelizmente uma corrida contra o tempo é o contexto para a piora da situação do bioma Caatinga (Torres *et al.* 2017).

Portanto é uma necessidade urgente cessar a degradação deste bioma e incentivar a implementação de um desenvolvimento sustentável para a preservação ambiental, e consequente defesa desse rico e exclusivo patrimônio Nacional (Tabarelli *et al.* 2017; Silva *et al.* 2017).

2.6 Registros de Espécies do Gênero *Entoloma* no Nordeste Brasileiro

No Brasil, as primeiras espécies do gênero *Entoloma* foram registradas por Spegazzi (1899) e Rick (1906), enquanto o primeiro registro de *Entoloma* no Nordeste brasileiro foi

feito por Singer (1965), sendo registrada como *Rodophyllus cantharelluloides*, depois sendo transferida por Horak (1977) para o gênero *Entoloma* como *Entoloma cantharelluloides* (Singer) Horak. Representantes da família *Entolomataceae* podem ser encontrados na maioria dos biomas brasileiros, na região Nordeste com uma maior predominância nos biomas da Mata Atlântica (Wartchow *et al.* 2011, Coimbra *et al.* 2013) e também no bioma Caatinga (Alves; Nascimento 2012).

Coimbra *et al.* (2014) em um levantamento registrou 107 espécies da família *Entolomataceae* distribuídas em diversas regiões, incluindo o Nordeste. Somente o gênero *Entoloma* possui 56 espécies registradas para o território brasileiro segundo revisão bibliográfica feita por Putzke; Putzke, 2000. Para o Nordeste somente 7 espécies tinham sido descritas, evidenciando o pouco conhecimento acerca de sua diversidade, embora existam novos registros para a ciência como *E. wednae* e *E. murinoalbum* (Coimbra, 2013; Horak 1982) indicando uma lacuna no conhecimento sobre a diversidade deste gênero para a região Nordeste do país, pois os últimos trabalhos datam de 2014.

Desse modo, este estudo propôs revisar a literatura sobre as espécies registradas atualmente para o Nordeste brasileiro, auxiliando o melhor entendimento sobre a distribuição, ocorrência e diversidade deste gênero na região do país.

3 Justificativa

O gênero *Entoloma* possui uma distribuição cosmopolita e ocorre em diversos habitats desde os altamente conservados até impactados, desenvolvendo funções ecológicas diversas para o restabelecimento dos ecossistemas. Embora o gênero possua uma grande diversidade registrada em continentes próximos aos trópicos, ainda a diversidade segue subestimada para o continente Sul-americano, trabalhos como este são necessários para um melhor conhecimento sobre sua distribuição e ocorrência de espécies.

Especialmente no Nordeste, o gênero possui ocorrência em áreas de Mata Atlântica e Caatinga. Trabalhos publicados na última década evidenciam uma riqueza de novas espécies, com a crescente qualificação de pesquisadores explorar essa região significa ter um melhor entendimento acerca da micodiversidade auxiliando em estratégias de conservação.

4 Objetivos

4.1 Objetivos Gerais

- Contribuir com o conhecimento sobre as espécies do gênero *Entoloma* subgênero *Entoloma* em coletadas em áreas de Mata Atlântica e Caatinga do Nordeste brasileiro a partir do uso de ferramentas morfológicas e moleculares, descrevendo morfolologicamente e filogeneticamente espécies deste grupo.

4.2 Objetivos Específicos

- Elaborar uma lista (*checklist*) de espécies de *Entoloma* no Nordeste
- Identificar e descrever as espécies coletadas
- Delimitar filogeneticamente as espécies com auxílio de ferramentas moleculares, de espécies que representem novas ocorrências ou que estejam em posição incerta/duvidosa.
- Relatar a ocorrência de novas espécies e registros de *Entoloma* para o Nordeste do Brasil.
- Preparar ilustrações das espécies identificadas/analizadas.

5 Material e Métodos

5.1 Levantamento de Materiais Depositados em Herbários da Região Nordeste

Uma revisão sobre quais espécies do gênero *Entoloma* possuem dados catalogados para o Nordeste do Brasil, por meio de pesquisas em fontes predominantemente virtuais com consulta em acervos científicos (Herbários JPB e URM). Foi utilizado como mecanismo de busca regional a plataforma SpeciesLink (Specieslink.net), usando como palavra chave "*Entoloma*" e delimitada por meio de filtros geográficos (Brasil e região Nordeste) e de coleções em herbários virtuais.

Espécies da região Nordeste publicadas em artigos de revistas científicas e que não constam na base de dados virtuais do site SpeciesLink também foram incorporadas ao estudo, sendo pesquisadas por mecanismos de buscas gerais da internet como google acadêmico (<https://scholar.google.com.br/?hl=pt>), ResearchGate (<https://www.researchgate.net/>) PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Scielo (<https://www.scielo.br/>), entre outros portais e revistas científicas, como Checklist (<https://checklist.pensoft.net/>), Scientifique (FranceArchives, <https://francearchives.fr/>), tendo como palavras chave "*Entoloma*" e "Northeast Brazil".

5.2 Análise Materiais Herborizados e Coleta de Espécimes

Análise e comparação de materiais herborizados provenientes dos locais de coleta: APA Barra do Rio Mamanguape (Rio Tinto, PB), Jardim Botânico do Recife (Recife-PE), Mata do Campus I da UFPB (João Pessoa, PB), Mata do Estado (São Vicente Férrer, PE), Parque Estadual de Dois Irmãos (Recife, PE), Parque Ecológico Professor João Vasconcelos

Sobrinho (Caruaru, PE), Refúgio Ecológico Charles Darwin (Igarassu, PE) e REBio Guaribas (Mamanguape, PB). Estes locais correspondem às áreas pertencentes principalmente ao Bioma Mata Atlântica, e os parques localizados nos municípios de Areia e Caruaru pertencem ao Bioma Caatinga (IBGE, 2004), respectivamente dos estados da Paraíba e Pernambuco. Espécimes publicados por Coimbra *et al.* (2013) e Magnago *et al.* (2015), que foram depositados nos herbários Padre Camille Torrend (URM-UFPE) e Lauro Pires Xavier (JPB-UFPB) também foram analisados.

Para a coleta, foram feitas expedições nas seguintes áreas: Parque Estadual Mata do Pau-Ferro (Areia, PB) e FLONA Restinga de Cabedelo (Cabedelo, PB). Os espécimes adicionais foram coletados em campo com auxílio de canivete, sacos de papel craft e maleta plástica de coleta e transportados até o Laboratório de Morfo-taxonomia de Fúngica (LMTF-UFPB) para análises.

5.3 Análises de Espécimes no Laboratório.

Os espécimes foram inicialmente descritos quanto sua macromorfologia enquanto frescos seguindo protocolos específicos para o gênero (ANEXO – A) colocados e mantidos em desidratador de alimentos durante 12-24h para desidratação e retirada de possíveis larvas ou insetos micófagos, seguindo o protocolo de Putzke; Putzke (1998). Logo após a desidratação, os espécimes permaneceram guardados em sacos plásticos tipo Ziplock 20x28 com fecho hermético, contendo esferas de sílica em gel para evitar a umidificação até sua análise.

As análises morfológicas foram realizadas por meio de cortes a mão livre de partes do basidioma (lamela, píleo, estipe) dos espécimes e montagem de lâminas com auxílio de hidróxido de potássio (KOH 3%), corante vermelho Congo (para pigmentação de estruturas) ou reagente de Melzer (melhor mensuração dos basidiósporos) de acordo com Largent (1986; 1994). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, durante o processo de análise foram feitos registros fotográficos e desenhos em câmara clara para produção de pranchas de imagens das microestruturas dos espécimes. Para identificação, foram usadas bibliografias especializadas (p. ex., Horak, 1977, 1982; Largent, 1994; Noordeloos; Gates, 2012; Coimbra *et al.* 2013, entre outros).

5.4 Métodos Extração e Sequenciamento

Todo o DNA genômico de uma amostra foi extraído como a seguir. Cerca de 0,125 cm³ foram homogeneizados com pistilo por 60 segundos em 150 uL de Chelex 100 a 5% (Bio-Rad, EUA). O tecido foi agitado em vórtice durante 10 segundos, incubado em água fervente durante 5 min, depois agitado novamente em vórtice durante 10 segundos e centrifugado a 10.000 rpm durante 90 segundos. Este método foi adaptado de (HwangBo *et al.* 2010). O sobrenadante foi utilizado como modelo para amplificação por PCR. Amplificações por PCR foram feitas para espaçadores transcritos internos completos 1 e 2 e o rDNA 5.8S (nuc-ITSrDNA) delimitado pelos primers ITS1 (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Branco *et al.* 1990) e gene 28S rDNA limitado por primers LR0R (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') e o iniciador reverso LR7 (5'-

TACTACCACCAAGATCT-3') (Moncalvo *et al.* 2000). As condições de PCR para amplificação consistiram em 1× tampão, dNTP a 0,2 mM, cada primer a 0,2 µM, MgCl₂ a 2 mM, 1U Taq polimerase e 2 µL de DNA molde, em um volume total de reação de 25 µL. O programa de ciclagem PCR foi usado para ambos os conjuntos de primers: 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 51 °C por 40 s e 72 °C por 1 min e concluindo com uma extensão de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram sequenciados bidirecionalmente no ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram editadas por meio da troca de bases degeneradas, com a finalidade de corrigir erros pontuais utilizando o programa Bioedit (Hall, 1999). Com as sequências geradas foram feitas matrizes para ambas as regiões ITS e LSU recuperando sequências similares de *Entoloma* depositadas no GenBank para análises filogenéticas (Köljalg *et al.* 2013). As sequências foram alinhadas automaticamente utilizando o algoritmo de alinhamento MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), implementado no programa MEGA v. 7.0.26 (Kumar, Stecher; Tamura 2015) e posteriormente também de forma manual utilizando o Clustal X v.2.0.9 (Larkin *et al.* 2007).

Para os modelos evolutivos de diferentes regiões foi utilizado o programa JModel-Test versão 3.7 (Posada 2006) Construímos árvores de máxima verossimilhança (ML) com RAxML (v.8.2.12) (Stamatakis, 2014) usando o modelo GTR GAMMA I e 1000 réplicas de bootstrap (BP). Uma árvore Bayesiana (BI) foi construída com MrBayes v.3.2.6 (Ronquist *et al.* 2012) executado a partir do programa Topali v.2.5 (Milne *et al.* 2004), para o método de máxima verossimilhança (MV) foram utilizados os programas MEGA7 v.7.0.26 (Kumar, Stecher; Tamura 2015) e MEGA11 v.11.0.13 (Kumar, Stecher; Tamura 2021) para a análise de Máxima Parcimônia (MP) foi utilizado o programa PaupUp v.4.0b10 (Swofford 2002). As sequências obtidas foram depositadas no GenBank sob os números de acesso OR365603 e OR365604, assim como o alinhamento final e as árvores geradas no TreeBASE com número de acesso 30942.

6 Resultados

6.1 Espécimes Depositados em Herbários do Nordeste Brasileiro

Atualmente, 66 registros de espécimes de *Entoloma* são encontrados nas bases de dados de herbários da região do Nordeste brasileiro (Tabela 1: Busca Specieslink). Em sua maioria, estão georreferenciados para os estados de Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba e Bahia, havendo poucos registros conhecidos ou nenhum para o Piauí, Alagoas, Sergipe e Maranhão (Fig. 1).

Tabela 1. Registros virtuais de espécimes do gênero *Entoloma* em herbários do Nordeste.

Herbário Virtual	Nº de Registros	Nº de Registros Identificados até Espécie	Nº de Registros Identificados até Gênero

URM/PE	21	20	01
UFRN-Fungos/RN	18	02	16
JPB/PB	13	03	10
CEPEC-Fungi/BA	06	02	04
HUFS/RN	02	00	02
INPA/BA	02	02	00
IPA/PE	02	02	00
F-Fungi	1	0	1
HUNEB	1	0	1
TOTAL	66	31	35

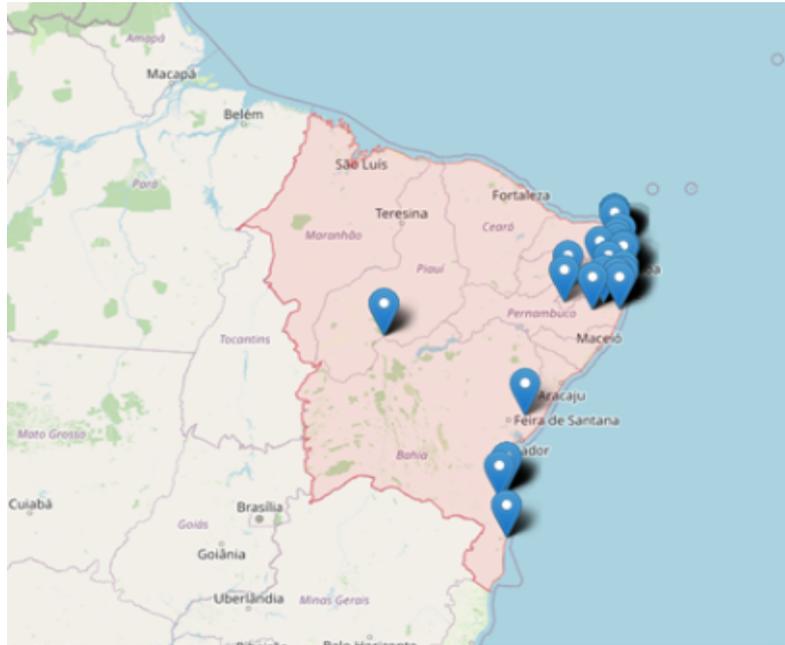


Figura 1. Registros de depósitos em herbários virtuais do Nordeste brasileiro. Fonte: Specieslink. Acesso em Janeiro de 2022.

6.2 Checklist de Espécies do Gênero *Entoloma* no Nordeste Brasileiro

Tabela 2. Registros de espécies do gênero *Entoloma* para o Nordeste Brasileiro publicados em periódicos.

Táxon	Localidade, Município, Estado	Coletor/Número de depósito	Referência
<i>E. aripoanum</i> Dennis	Usina São José (Mata de Piedade), Igarassu, PE	Wartchow, F s.n. 18/08/2005. URM 80085	Horak (1977); Wartchow (2011); Coimbra <i>et al.</i> (2013)
<i>E. alboserrulatum</i> (Rick) Putzke & Cavalcanti	Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife, PE	Coimbra, VRM; L. Trierveiler-Pereira; J.M. Baltazar s.n. 19/07/2008. URM 82271	Putzke & Putzke (2000)
<i>E. avilanum</i> (Dennis) E. Horak	Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife, PE	Coimbra, VRM; L. Trierveiler-Pereira; J.M. Baltazar s.n. 13/08/2008. URM 82273	Coimbra <i>et al.</i> (2013)
<i>E. bloxamii</i> (Berk. & Broome) Sacc.	Campus I da UFPB, João Pessoa-PB.	Magnago, AC; Furtado, ANM 245 02/07/2010. JPB 50671.	Magnago <i>et al.</i> (2015)
<i>E. caribaeum</i> (Pegler) Courtecuisse & Fiard.	RPPN Carnijó, Moreno-PE.	Coimbra, VRM; L. Trierveiler-Pereira; J.M. Baltazar s.n. 21/05/2009. URM 82264	Coimbra <i>et al.</i> (2013)
<i>E. cantarelluloides</i> (Singer) E.Horak	João Pessoa, Paraíba, PB	R. Singer 11/07/1960 Holotype BAFC B3360	Singer (1965 como <i>Rhodophyllus</i>), Horak (1977)

<i>E. dragnosporum</i> (Singer) E. Horak	Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife-PE; RPPN Carnijó, Moreno-PE; RVS Gurgauí, Mata do Xangô, Cabo de Santo Agostinho-PE; Mata do Jiqui, Parnamirim-RN	Coimbra, VRM; L. Trierveiler-Pereira; J.M. Baltazar s.n. 13/08/2008. URM 82260; 08/07/2008. URM 82261; Wartchow, F s.n. 21/06/2004. URM 78668; Ali, M.S.; Fazolino, E.P.; Pinheiro, M.P.G. s.n. 04/07/2008. UFRN-Fungos 845	Wartchow (2006); Coimbra <i>et al.</i> (2013)
<i>E. inocephalum</i> (Romagn.) Dennis	Mata do Estado, São Vicente Férrer-PE	Coimbra, VRM; L. Trierveiler-Pereira; J.M. Baltazar s.n. 19/07/2008. URM 82263	Coimbra <i>et al.</i> (2013)
<i>E. luteosplendidum</i> E. Horak & Cheype	RPPN Carnijó, Moreno-PE; Campus I da UFPB, Reserva Ecológica, João Pessoa-PB; Millennium Inorganic Chemicals Mineração Ltda, Trilha dos Macacos, Mataraca-PB;	Coimbra, VRM; L. Trierveiler-Pereira; J.M. Baltazar s.n. 21/05/2009. URM 82259; Wartchow, F 05/07/2011. JPB46809. Wartchow, F. 07/07/2011. JPB 46810	Coimbra <i>et al.</i> (2013)

<i>E. murinoalbum</i> E. Horak & Singer	Próximo ao rio Buranhém, Porto Seguro-BA.	Singer, R. B11198 14/06/1978. INPA-Fungos 81187	Horak (1982)
<i>E. radicans</i> Pegler	Mata do Estado, São Vicente Férrer-PE	Coimbra, VRM; L. Trierveiler-Pereira; J.M. Baltazar s.n. 28/08/2008. URM 82267	Coimbra <i>et al.</i> (2013)
<i>E. speciosum</i> (Romagn.) Putzke & Putzke	RPPN Carnijó, Moreno-PE	Coimbra, VRM; L. Trierveiler-Pereira; J.M. Baltazar s.n. 21/05/2009 URM 82270	Coimbra <i>et al.</i> (2013)
<i>E. siparianum</i> Dennis	Parque Natural Municipal João Vasconcelos Sobrinho, Caruaru-PE	Coimbra, VRM; L. Trierveiler-Pereira; J.M. Baltazar s.n. 03/06/2009. URM 82265	Coimbra <i>et al.</i> (2013)
<i>E. serrulatum</i> (Fr.) Hesler	Campus X, Teixeira de Freitas-BA	Silva, L. R -	Silva & Fortuna (2020)
<i>E. tucuchense</i> Dennis	“Mata de Piedade” Usina São José, Igarassu-PE	Wartchow, F. 18. 22/07/2005. URM 80086	Wartchow <i>et al.</i> (2011); Coimbra <i>et al.</i> (2013)
<i>E. wednae</i> V. Coimbra & Wartchow	Mata do Estado, São Vicente Férrer-PE	Coimbra, VRM; L. Trierveiler-Pereira; J.M. Baltazar s.n. 19/07/2008. Holotípo URM82268; 26/06/2008 URM 82269.	Coimbra <i>et al.</i> (2013)

<i>E. virescens</i> (Sacc.) E. Horak ex Courtec.	Comunidade de Bom Gosto, Pacujá-CE	Alves, M. H and Nascimento, C. C. 16/03/2011, TEPB 072/11	Alves & Nascimento (2012)
<i>E. vitellinum</i> (Sing.) Horak	Camaragibe, Pernambuco (PE)	BAFC, B 3135, holotype	Horak (1977)

Tabela 3. Registro de espécimes identificados e depositados nos herbários, mas não publicados em periódicos.

<i>E. rhodopolium</i> (Fr.) P. Kumm.	Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife-PE.	Silva, O.S. s.n. 28/02/1955. URM 2014
<i>E. pinnum</i> (Romagn.) Dennis	Faz. Ferkau, Sapucaieira, Ilhéus-BA	Wartchow F. 2 31/07/2007. CEPEC-Fungi 766
<i>E. aff. conferendum</i> (Britzelm.) Noordel.	Parque Estadual Dunas de Natal, Trilha da Geologia, Natal-RN	Sulzbacher, M.A. 433 06/08/2012. UFRN-Fungos 1764
<i>E. cetratum</i> (Fr.) Moser.	Dois Irmãos, Jardim ZooBotânico, Recife-PE	Nery, J. 2598. IPA 38067
<i>E. cyathiforme</i> Dennis	Porto Seguro-BA	Singer, R B11190 14/06/1978. INPA-Fungos 81186
<i>E. nigricans</i> Peck	Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife-PE.	Silva, JN s.n. URM 554; Nery, J. 2865, IPA 39057
<i>E. spadix</i> Hesler	Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife-PE.	Coimbra, VRM; L. Trierveiler-Pereira; J.M. Baltazar s.n. 07/07/2008. URM 82272

6.3 Sequências Geradas

Foram utilizados três espécimes para extração de material genético e análises moleculares. Sendo um deles proveniente de uma das coletas realizadas na Reserva Mata do Pau Ferro, Areia-PB.

IC_67 Entoloma sp
IC_68 Entoloma sp
IC_69 Entoloma sp

Areia - PB

JPB 65667
FW30/2021
FW39/2019

LR0R/LR7 ITS6/8
LR0R/LR7 ITS6/8
LR0R/LR7 ITS6/8

Figura. 2 - Resultado de sequenciamento de espécimes do gênero *Entoloma*. Fonte: Felipe Wartchow.

Duas sequências foram geradas para cada espécime sendo uma para ITS e uma correspondente a região LSU, totalizando seis sequências para posterior tratamento bioinformático e respectivos depósitos nos bancos de dados Genbank, NCBI e outros. Duas sequências foram já editadas e depositadas no NCBI com os números identificadores para LSU e ITS sendo OR365603 e OR365604 respectivamente.

6.4 Nova Espécie do gênero *Entoloma*.

Entoloma hygropileum L. F. Silva & Wartchow, **sp. nov.** MycoBank: MB851355

Tipo: Brasil, Paraíba, Areia, Parque Estadual Mata do Pau-Ferro, Trilha do Cumbe, 24 Jul 2019, F. Wartchow FW 15/2019 (JPB 65667, holotypus hic designatus!) Etimologia: do grego *hygro* (= úmido, úmido) e *pilum* (= boné, píleo); devido à superfície do píleo muito úmida.

Basidioma pequeno e robusto, tricolomatóide a ligeiramente cliticobóide. Píleo 42 mm, plano-convexo, marrom (OAC 722) depois mais escuro (OAC 727) às vezes marrom acinzentado (mais escuro que OAC 768) ou com tons amarelos (OAC 803) no centro; superfície lisa, muito úmida a quase viscosa, glabra e brilhante; contexto com 4 mm de espessura, branco aquoso, imutável; odor levemente adocicado. Lamelas amplamente adnadas com dente decorrente curto, creme (OAC 815) a salmão (OAC 655), distante, 5 mm de largura; borda inteira, concolor nas laterais; lamélulas freqüentes, com comprimentos diversos, atenuadas. Estipe 30 × 5 mm, excêntrico, creme, superficial, aparentemente longitudinal, muito levemente, escamoso comprimido, glabro; contexto esbranquiçado, imutável, sólido. Basidiósporos 6,8–8,6 × 6,1–7,6, (\bar{x} = 7,6 ± 0,5 × 7,1 ± 0,4 μm; Q = 1,00–1,20; Q = 1,10 ± 0,3), isodiamétrico a às vezes subisodiamétrico, angular com 5 a 6 ângulos rombos, rosado pálido, paredes ligeiramente espessas; conteúdo como grande gutule; apêndice hilar cônico, sublateral. Basídios 34,6–50,9 (–51) × 7,1–9,7 (–10,2) μm (\bar{x} = 40,9 ± 4,4 × 7,7 ± 0,8 μm; Q = 5,3 ± 0,3) clavados principalmente delgados a às vezes subcilíndricos, hialinos, de paredes finas, com 4 sterigmata variando até 3 μm de altura. Pleurocistídios e queilocistídios ausentes. Lamelas trama regulares, com hifas hialinas estreitas de larguras variáveis, conexões em pinça presentes, 16,6–61,7 × 3,9–8,8 μm. Pileipellis callidermic, duas camadas variando até 55 μm de espessura; suprapellis com 15 μm de espessura feito de pillocistídios versiformes de cor clara espalhados até 14–40 × 10–15 μm, lageniformes a ventricosos ou sacados, às vezes subcilíndricos, de paredes finas, não incrustados; subpellis com 30 μm de espessura com hifas

de células curtas infladas mais compactas com cerca de 5 células de profundidade $7,5\text{--}12,7 \times 6,1\text{--}9,2 \mu\text{m}$, também pálidas incolores e células infladas versiformes e hifas um tanto radialmente orientadas, não incrustadas. Caulocistídios muito ocasionais $4,9\text{--}10,8 \times 2,4\text{--}5,9 \mu\text{m}$, clavados, pigmentados claros, paredes finas. Stipe trama com hifas orientadas longitudinalmente de comprimentos variáveis $29,4\text{--}63,7 \times 3,9\text{--}10,7 \mu\text{m}$, subparalelas. Hifas oleíferas e glóbulos lipídicos ausentes. Pigmentação citoplasmática, não incrustada. Conexões de pinça comumente encontradas em todos os tecidos examinados. Hábito e habitat: solitário no solo entre serapilheira em mata de brejo de altitude.

Distribuição conhecida: conhecida apenas na localidade-tipo. Comentários sobre o estado de conservação: A nova espécie foi coletada em uma unidade de conservação com alto grau de intervenção humana ilegal (Barbosa *et al.* 2017) e não existe plano de manejo para este parque (Pereira *et al.* 2019, Campos; Lima 2020). Além disso, há relatos de que os efeitos de borda resultantes da perda de habitat ultrapassam os 50 m no gradiente fronteira-interior (Campos *et al.* 2018, Marques *et al.* 2019). No entanto, os dados sobre a população e abundância de *E. hygropileum* são limitados e apenas pesquisas futuras mostrarão a classificação apropriada de ameaça. Assim, sugerimos aqui a categoria de dados deficientes (DD) antes de enfrentá-la nos critérios de status de ameaça da IUCN (2022).

Figura 3. Árvore filogenética derivada da análise Bayesiana, baseada em dados da região LSU. Os valores são somados nos nós ($\geq 75\%$ para bootstrap ML / $\geq 75\%$ para bootstrap MP / $\geq 0,75$ para probabilidade posterior de BI, respectivamente). A barra de escala representa o número de alterações de nucleotídeos por local. Tipo de espécie em *T* (itálico maiúsculas). As novas espécies estão em negrito e itálico.

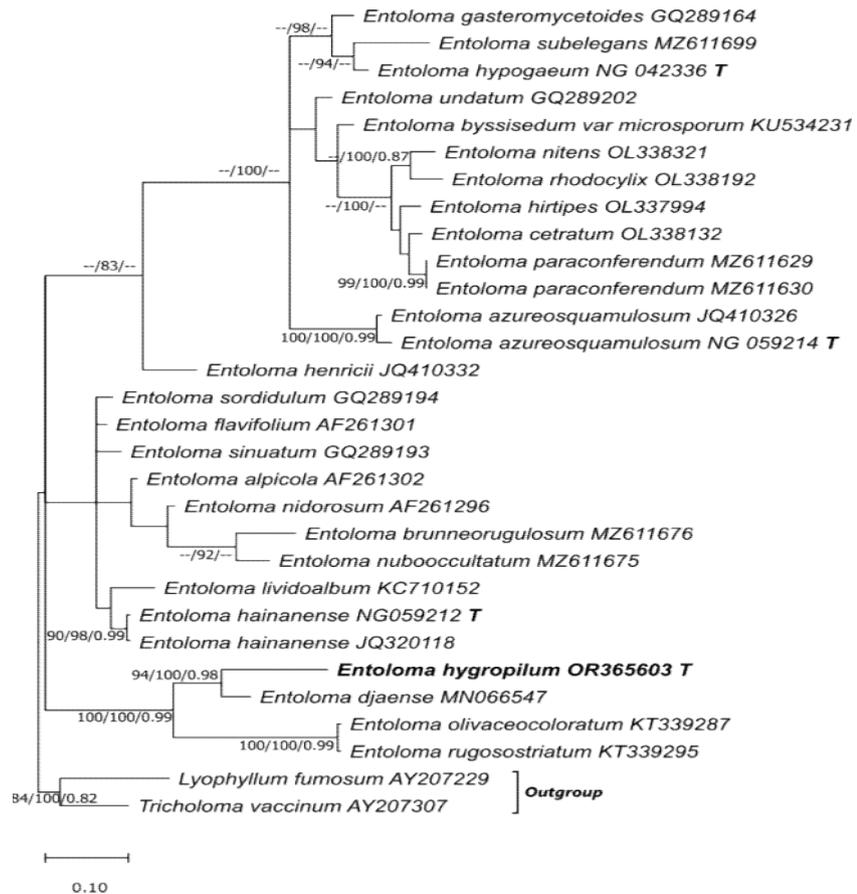
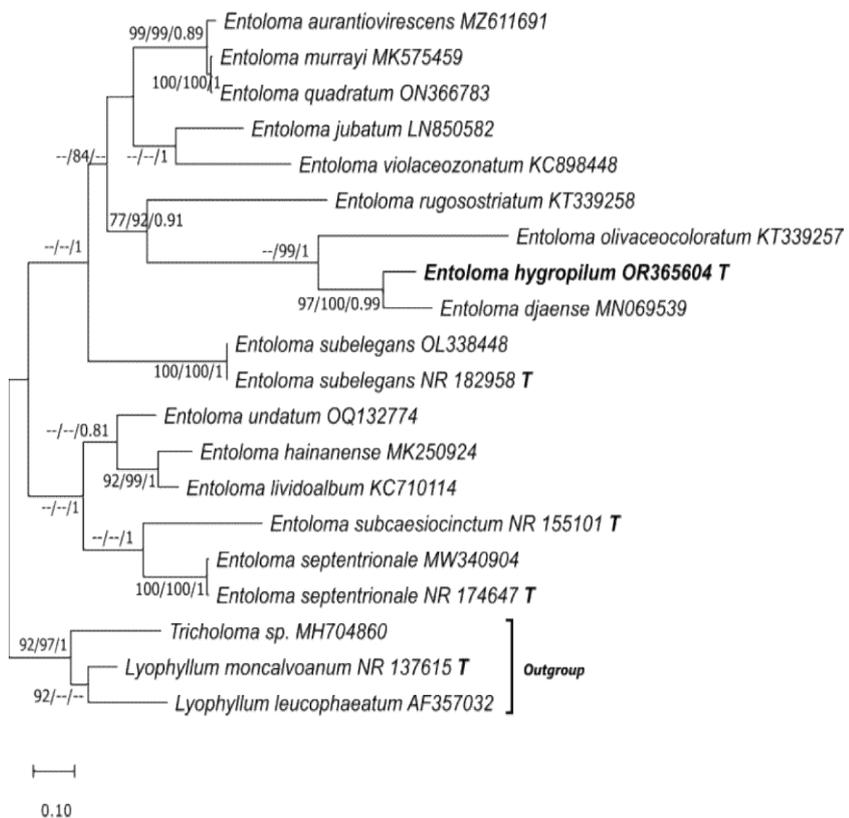


Figura 4. Árvore filogenética derivada de análise bayesiana, baseada em dados das regiões ITS. Os valores são somados nos nós ($\geq 75\%$ para bootstrap ML / $\geq 75\%$ para bootstrap MP / $\geq 0,75$ para probabilidade posterior de BI, respectivamente). A barra de escala representa o número de alterações de nucleotídeos por local. Tipo de espécie em *T* (itálico maiúsculas). As novas espécies estão em negrito e itálico.



Possíveis Novos Registros

Entoloma sect. *Calliderma* (Largent & Hekel)

Píleo 38-54 mm, superficialmente plano, depresso umbonado, azul escuro (OAC 341) com pontos violeta (OAC 432) oriundas da margem, superfície glabra radialmente venosa, margem inteira, contexto branco úmido. Lamelas sinuadas, emarginadas salmão a bege (OAC 654, 655), borda denteada, concolor, lamellulas com diferentes comprimentos. Stipe 35-55 × 5-7 mm, central, afinado na base, azul cinzento (OAC 331, 332), amarelo creme (OAC 857) na base, longitudinalmente fibriloso (em lupa), contexto sólido, branco úmido, imutável.

Bioma: Mata atlântica

Hábito: Agrupado

Substrato: Serapilheira, solo.

Local de Coleta: Rebio Guaribas, Mamanguape-PB. Brazil. 30-07-2021.

Entoloma bakeri Dennis.

Píleo 10 mm, plano umbonado levemente depresso bege rosado (OAC 696), margem inteira, radialmente fibrilosa, brilhante. Lamela sinuada, denteada, regular, 3 lamelulas, concolor bege (AOC 969). Estipe central 80 mm × 10 mm, fibroso, levemente clavado; contexto oco, bege amarelado (OAC 815).

Bioma: Mata atlântica

Hábito: Solitário.

Substrato: Serapilheira, solo.

Local de Coleta: Rebio Guaribas, Mamanguape-PB. Brazil. 19-07-2021.

6.5 Ilustrações e Pranchas Elaboradas.

Entoloma hygropileum L. F. Silva & Wartchow, **sp. nov.**

MycoBank: MB851355



Figura 5. Basidioma de *Entoloma hygropileum*. a, b, d = 10 mm. c = 20mm. Fonte: Felipe Wartchow.

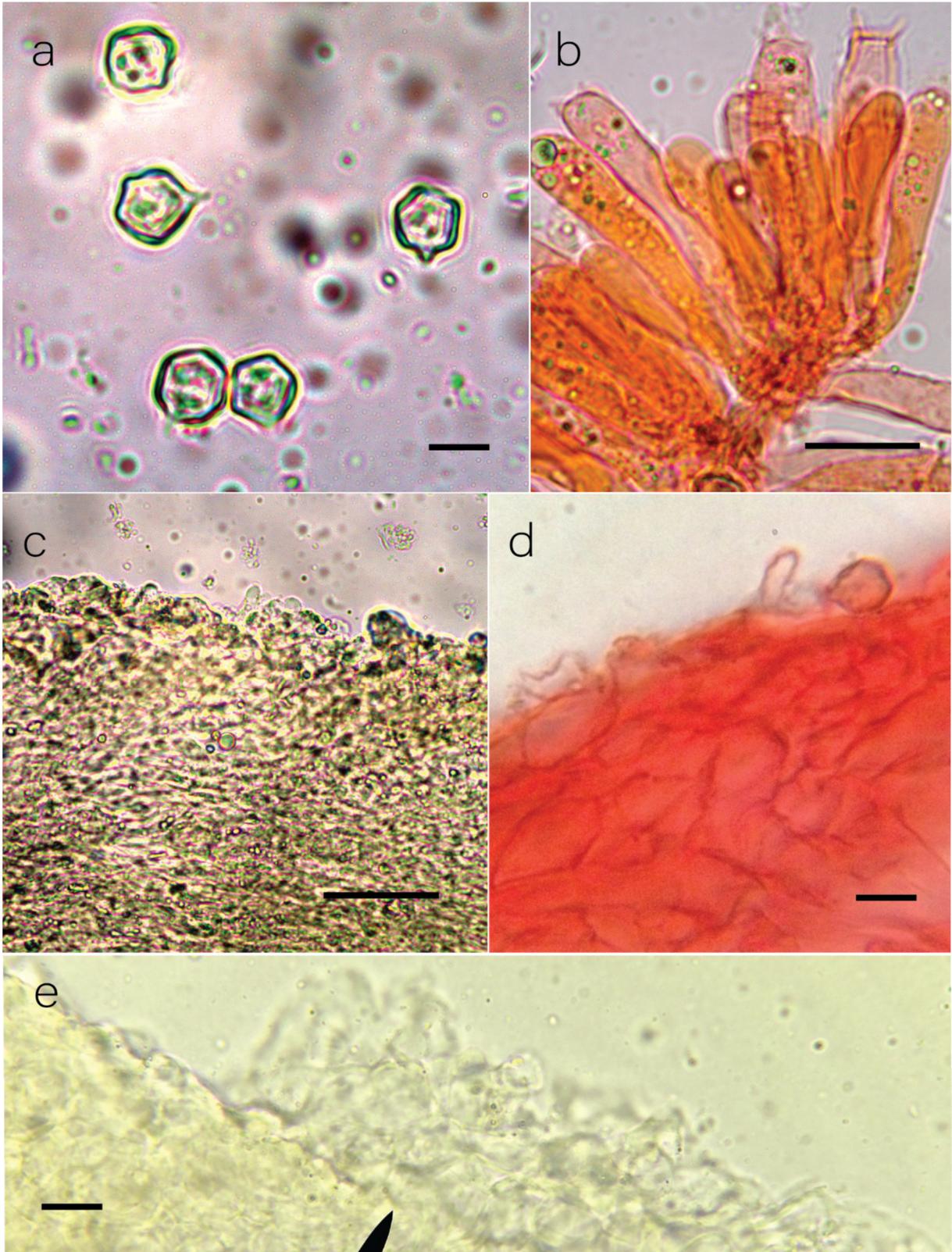


Figura 6. Prancha com imagens microscópicas de *E. hydropileum* (Holótipo). a. Basidiósporos. b. Basídia. c. Pileipellis com elementos inflados. Barras de escala: a = 10 μm ; b, c = 20 μm . Fotos: Leonardo Firmino e Felipe Wartchow.

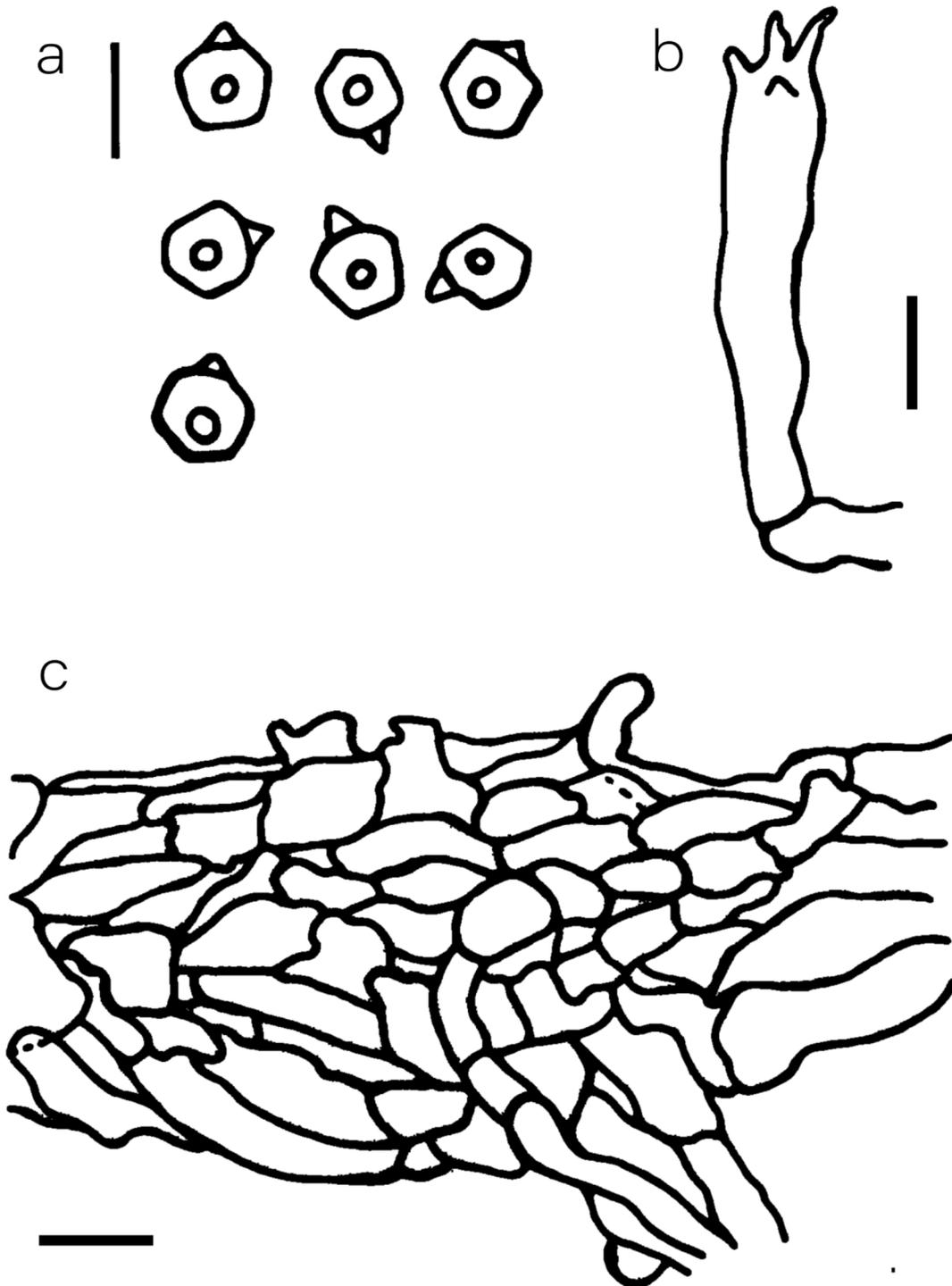


Figura 7. Ilustrações de *Entoloma hygropileum* (Holótipo). a. Basidiósporos. b. Basídia. c. Pileipellis com elementos inflados. Barras de escala: a = 10 μm ; b, c = 20 μm . Fonte: Autor.

Entoloma sp. (Subgen. *Calliderma*)



Figura 8. Basidiomas *Entoloma* sp. (subgen. *Calliderma*). Barra de escala = 30mm. Fonte: Felipe Wartchow.

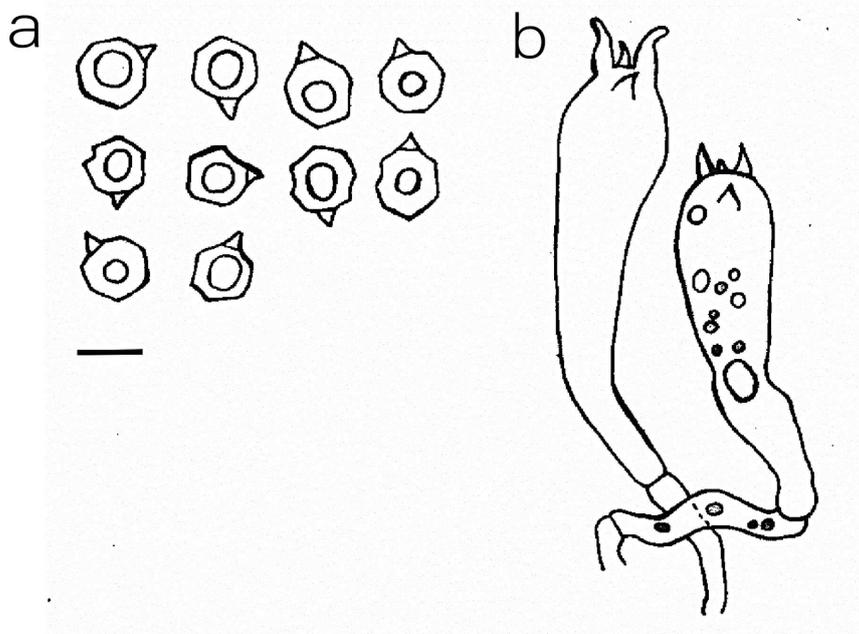


Figura 9. Ilustrações das estruturas microscópicas reprodutivas *Entoloma* sp. (subgen. *Calliderma*). a. Esporos b. Basídios. Barras de escala: a = 10 μ m; b = 20 μ m. Fonte: Autor.

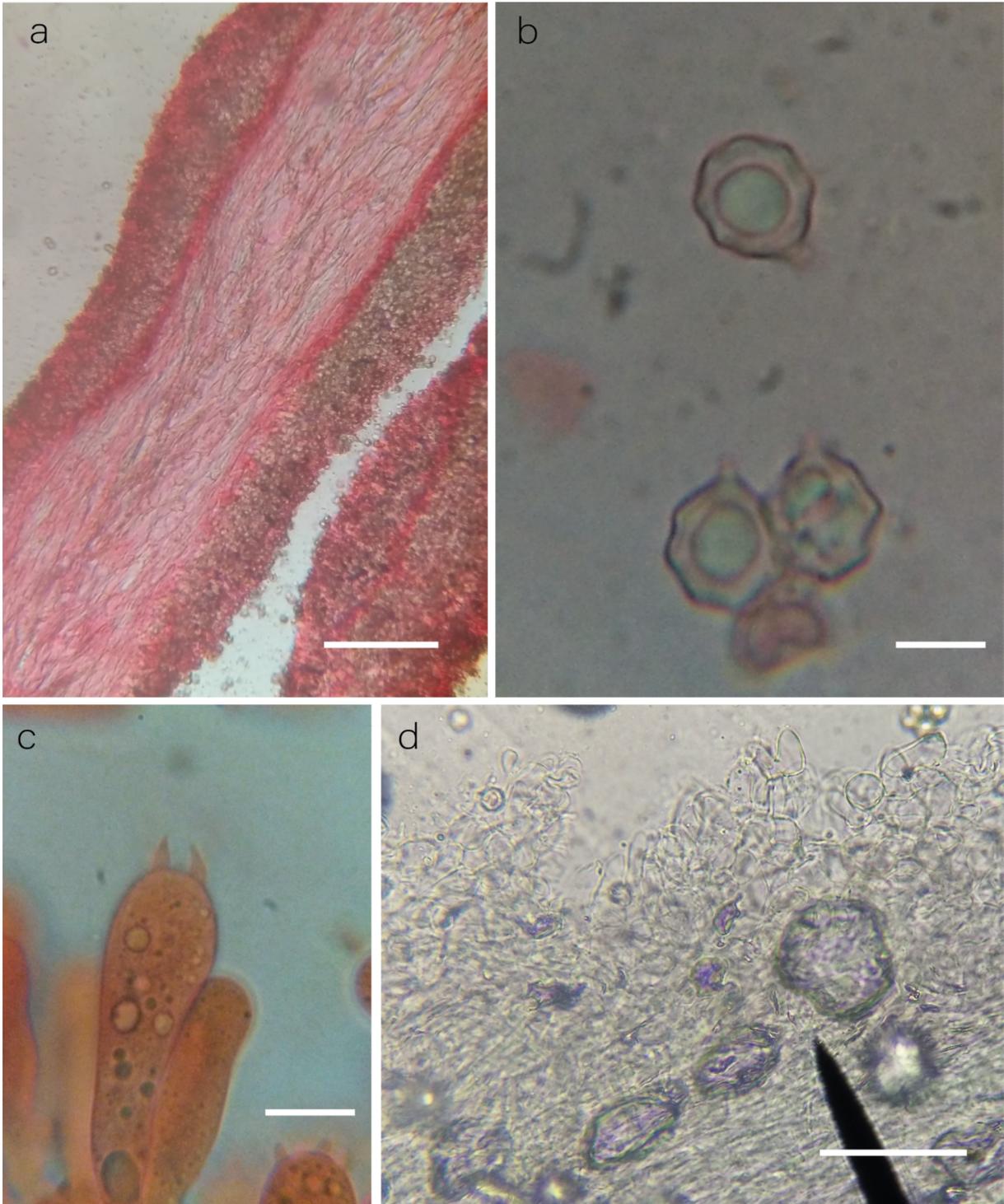


Figura 10. Prancha com imagens microscópicas de *Entoloma* sp. (subgen. *Calliderma*). a. Trama da lamela. b. Basidiósporos. c. Basídia. d. Pileipellis com camada de células paliçádicas (suprapelis) e pigmentação violeta (subpelis). Barras de escala: a = 1 mm; b, c = 10 µm. d= 20 µm. Fotos: Leonardo Firmino e Felipe Wartchow.

Entoloma bakeri Dennis.

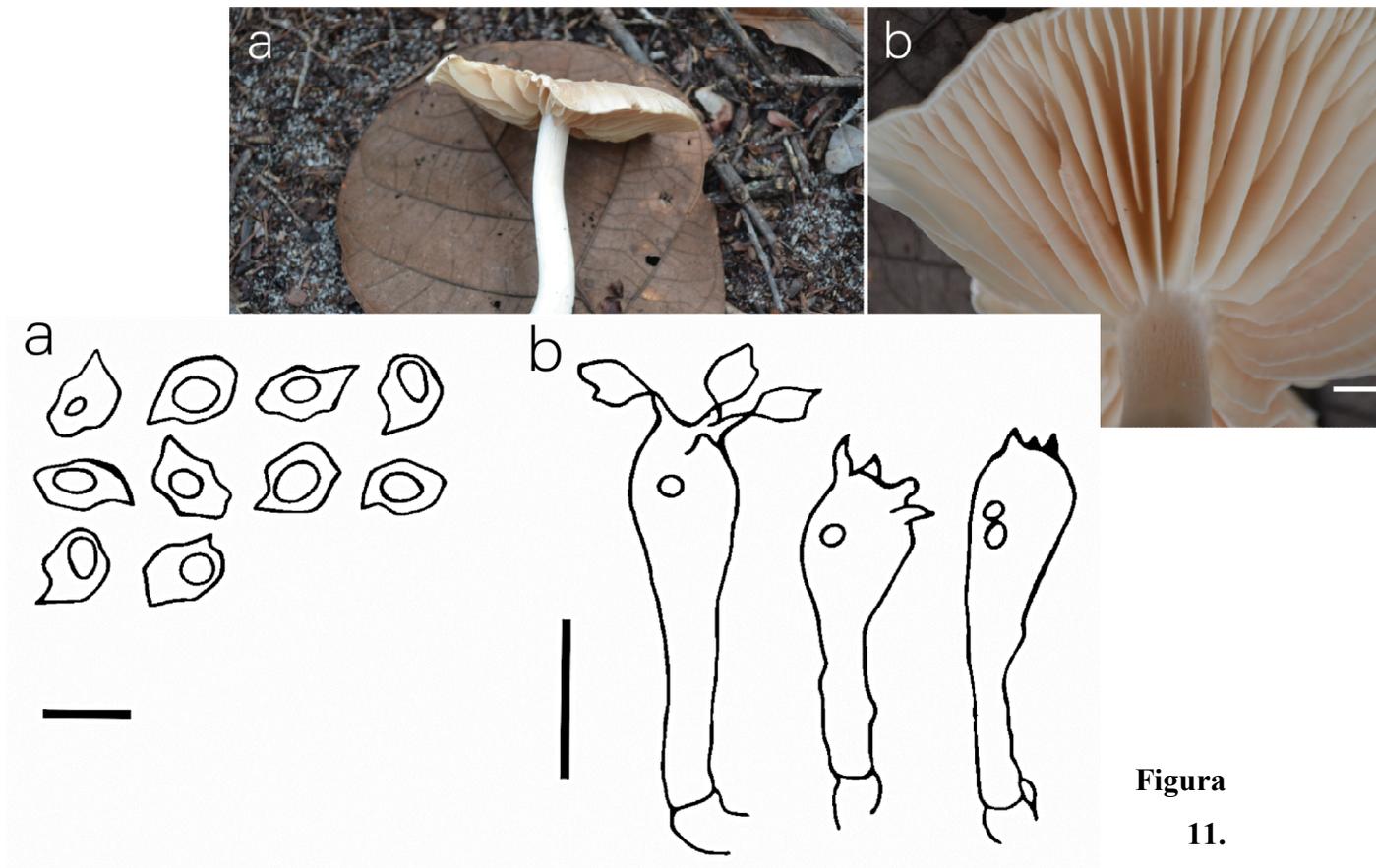


Figura
11.

Basidioma de *Entoloma bakeri* Dennis. a. Basidioma; b. lamelas do píleo. Barras de escala a=50mm; b=30mm. Fonte: Felipe Wartchow.

Figura 12. Ilustrações das estruturas microscópicas reprodutivas *Entoloma bakeri* Dennis. a. Esporos b. Basídios. Barras de escala: a = 10 μm ; b = 20 μm . Fonte: Autor.

7 Discussão

As altas taxas de endemismo nos biomas da Mata Atlântica e Caatinga indicam uma crescente necessidade de estudo e revisão dos espécimes depositados e coletados em herbários da região Nordeste, para o gênero *Entoloma* a última revisão feita ocorreu a mais de uma década (Coimbra, 2013). Muitas coletas feitas nestes biomas resultam em depósitos que são identificados apenas a nível de gênero, necessitando de uma maior acurácia em análises posteriores, a ocorrência dos espécimes está frequentemente ligada ao bioma da mata atlântica, não se sabendo ao certo se esta diversidade realmente é mais elevada em um bioma em relação ao outro, pois está confirmada a ocorrência do gênero na Caatinga em outros trabalhos como os de Alves; Nascimento 2014 e Wartchow; Braga-Neto (2019), isso indica uma ausência de coletas no bioma Caatinga, que pode existir por falta de investimento em pesquisas taxonômicas e/ou ausência de profissionais capacitados para produção de levantamento descrição destes espécimes.

Neste estudo, a partir de um levantamento em herbários virtuais e demais meios, foram pesquisados registros publicados e não publicados sobre o gênero na região Nordeste. Em sua maioria depositados em herbários da Paraíba e Pernambuco. Isto pode ocorrer pela presença de pesquisadores micologistas mais acentuada nesta região. Mesmo com um número elevado de depósitos do nordeste, representando 66 depósitos correspondentes ao gênero *Entoloma*, destes mais da metade (35 depósitos) são identificados até o nível de gênero. Ocorrendo outros problemas como identificação incerta e não publicação na base de dados dos herbários e em periódicos científicos. Uma proposta interessante para sanar tais inconformidades seria a avaliação destes depósitos em análise morfológica e molecular, para atualização destes dados. Por meio de análise genéticas utilizando primers para ITS e LSU é possível identificar corretamente os atuais espécimes já coletados e determinar novas ocorrências a nível local e mundial.

A ocorrência de *E. hygropileum* corrobora com a presença de *E.* subg. *Entoloma*, já indicada pelos registros de *Entoloma wednae* nos estados de Pernambuco e Bahia (Coimbra *et al.* 2013, Ribeiro *et al.* 2023), ambas espécies apresentam hábito Callidermatoide, possuindo uma camada de células paliçádicas e fusiformes na sua pileipelis categorizado uma antiga seção do por Romagnesi (1941) e *Rodophyllus*, transferida para o gênero *Entoloma* por Noordelos (1983) e elevada a gênero por Largent (1994). Pelo menos duas descrições microscópicas feitas neste trabalho apresentaram tais características, ambas coletadas na Mata Atlântica nordestina.

Ao analisarmos filogeneticamente uma das espécies de hábito callidermatóide, *E. hygropileum*, foi possível constatar uma similaridade considerável a outras espécies presentes em matas neotrópicas, como o continente Africano. As espécies *E. djaense* e *E. jubatum*, foram as mais próximas, ambas compartilham com *E. hygropileum* características como o formato e número de ângulos em seus respectivos esporos, pileipelis apresentando células com aspecto fusiformes, porém distinguindo-se quanto a presença frequente de pilocistídios e presença ou ausência de pigmentos intracelulares, isto pode sugerir uma questão de isolamento geográfico destas espécies com o mantimento da característica calidermatóide. No segundo espécime analisado uma diferença foi notada quanto ao grau dos ângulos formados em seus esporos, pigmentação violeta presente e elementos inflados mais frequentes (*Entoloma* sp.).

Um outro espécime foi descrito foi *E. bakeri* Dennis. este possui mais de uma exsicata depositada, ocorrendo com certa frequência em coletas em regiões da mata paraibana, diferentemente dos outros dois espécimes descritos, possui esporos heterodiamétricos e maiores possuindo entre 5 e 8 ângulos, ocorrendo com certa frequência serapilheira atuando como saprobios com ocorrência já confirmada para a América do Sul por Horak (1978).

Os métodos moleculares e filogenéticos podem auxiliar significativamente na inferência do parentesco das espécies dentro do gênero *Entoloma*, uma vez que espécies podem ser diferenciadas com maior exatidão, porém não exclusivamente por este meio. A morfologia dos esporos e demais estruturas microscópicas (principalmente microscópicas como pilocistídeos, grampos de conexão) são importantes para diferenciar espécies que possuem uma alta similaridade, porém estruturas e hábitos distintos. Em biomas como a Mata Atlântica e Caatinga, diferentes filtros ambientais atuam, requerendo diferentes adaptações

dos macrofungos, armazenamento de água, proteção solar e associações com seres vegetais por meio de relações ecto ou endomicorrizicas.

8 Considerações Finais

1. O gênero *Entoloma* subgenero *Entoloma* está presente no Nordeste e possui ocorrências registradas nos estados da Paraíba e Pernambuco.
2. 19 espécies do gênero *Entoloma* ocorrem no Nordeste brasileiro e estão devidamente identificadas a nível de espécie e publicadas em periodicos Nacionais e Internacionais.
3. A nova espécie descrita *Entoloma hygropileum* possui proximidade filogenética com a espécie africana *E. djaense* com significativos valores de suporte.
4. É necessária uma revisão morfológica e genética de todas as coletas depositadas em herbários Nordestinos para a real determinação da diversidade e distribuição do gênero *Entoloma* na região.

REFERÊNCIAS

- Agerer, R.; Waller, K. (1993). Mycorrhizae of *Entoloma saepium*: parasitism or symbiosis? *Mycorrhiza*, v. 3, p. 145-154.
- Alves M, Nascimento C (2012) *Entoloma virescens* (Sacc.) E. Horak ex Courtec., 1986 (Agaricales: *Entolomataceae*): primeiro registro para o bioma Caatinga, Ceará, Brasil. *Lista de verificação* 8(3): 577-580.
- Baroni, T.J.; Matheny P.B. (2011). A re-evaluation of gasteroid and cyphelloid species of *Entolomataceae* from eastern North America. *Harvard Papers in Botany* 16 (2), 293-310.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17: 540–552.
- Cardoso, J.T. (2016). A Mata Atlântica e sua conservação. *Encontros Teológicos*. Florianópolis-SC, V.31, N.3, p. 441-458.
- Coelho, G.D; Sousa, J.P; Lima, C. A.; Lins, S.A.S. (2018). Potencial de fungos da caatinga para produção de enzimas amilolíticas. v. 7 n. 2: *Revista saúde & ciência online*.
- Co-david, D.; Lanheveld, D.; Noordeloos, M.E., (2009). Molecular phylogeny and spore evolution of *Entolomataceae*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 23:147-176.
- Coimbra, V.R.M. (2014). Checklist of Central and South American Agaricales (Basidiomycota) I: *Entolomataceae*. *Mycosphere*. 5 (3): 475-487.
- Coimbra, V.R.M.; Wartchow, F.; Gibertoni, T.B. (2013). Studies on *Entoloma* (Agaricales, Basidiomycota) in the Atlantic Forest, Northeast Brazil. *Nova Hedwigia* 97(1-2):139-157.
- CRUZ e SOUZA, João da. Sorriso interior. *Últimos sonetos*. Rio de Janeiro: UFSC/Fundação Casa de Rui Barbosa/FCC, 1984.
- Dentigner, B.T.M.; Mmargaritescu, S.; Monclavo, J.M. (2010). Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. *Molecular Ecology Resources* 10: 628-633,
- Gardes, M.; Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113–118.
- Gouy, M.; Guindon, S.; Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2): 221–224.
- He, M.Q., Zhao, R.L., Hyde, K.D., Begerowm D., Kemler, M., Yurkovm A., McKenziem E.H.C., Raspé, O., Kakishimam M., Sánchez-Ramírez, S., Vellingam E.C., Halling, R.E., Papp. V., Zmitrovich, I.V., Buyck, B., Ertz, D., Wijayawardene, N.N., Cui, B.K., Schouttetten, N., Liu, X.Z., Li, T.H., Yao, Y.J., Zhu, X.Y., Liu, A.Q., Li, G.J., Zhangm M.Z., Ling, Z.L., Cao, B., Antonín, V., Boekhout, T., da Silva, B.D.B., De Crop, E., Decock, C., Dima, B., Dutta, A.K., Fell, J.W., Geml, J., Ghobad-Nejhad, M., Giachinim A.J., Gibertoni, T.B., Gorjón, S.P., Haelewaters, D., He, S.H., Hodkinson, B.P., Horak, E., Hoshino, T., Justo, A., Lim, Y.W., Menolli Jr., N., Mešić, A., Moncalvo, J.-M., Mueller, G.M., Nagy, L.G., Nilsson, R.H., Noordeloos, M., Nuytinck, J., Orihara, T., Ratchadawan, C., Rajchenberg, M., Silva-Filho, A.G.S., Sulzbacher, M.A., Tkalčec, Z., Valenzuela, R., Verbeken, A., Vizzini, A., Wartchow, F., Wei, T.Z., Weiß, M., Zhao, C.L.; Kirk, P.M. 2019. Notes, outline and divergence times of Basidiomycota. *Fungal Diversity* 99: 105-367.

- Horak, E. (1977). *Entoloma* in South America. I. *Sydowia* 30, 40–111.
- Horak, E. (1980). *Entoloma* (Agaricales) in Indomalaya and Australasia. Beihefte *Nova Hedwigia* 65: 1–352.
- Horak, E. (1982). *Entoloma* in South America. II. *Sydowia* 35, 75-99.
- IBGE. (2004). Mapas de Cobertura Vegetal dos Biomas Brasileiros. Ministério do Meio Ambiente, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Geociências Brasília.
- Karstedt, F.; Capelari, M. (2010). New species and new combinations of *Calliderma* (*Entolomataceae*, Agaricales). *Mycologia*. 102. 163-73. 10.3852/09-019.
- Karstedt, F.; Capelari, M. (2017). A new species of *Entoloma* subgenus *Trichopilus* from Atlantic Forest Region (Brazil). *Sydowia* , v. 69, p. 23-28.
- Katoh, K.; Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Kirk, P.F.; Cannon, P.F.; Minter, D.W.; Stalpers, J.A. (2008). Dictionary of the fungi, 10th ed. *CAB International*, 771 p., Wallingford, UK.
- Köljalg, U.; Nilsson, R.H.; Abarenkov, K.; Tedersoo, L.; Taylor, A.F.; Bahram, M.; Bates, S.T.; Bruns, T.D.; Bengtsson, P.J.; Callaghan, T.M.; Douglas, B.; Drenkhan, T.; Eberhardt, U.; Dueñas, M.; Grebenc, T.; Griffith, G.W.; Hartmann, M.; Kirk, P.M.; Kohout, P.; Larsson, E.; Lindahl, B.D.; Lücking, R.; Martín, M.P.; Matheny, P.B.; Nguyen, N.H.; Niskanen T.; Oja J.; Peay, K.G.; Peintner, U.; Peterson, M.; Pöldmaa, K.; Saag, L.; Saar, I.; Schüßler, A.; Scott, J.A.; Senés, C.; Smith, M.E.; Suija, A.; Taylor, D.L.; Telleria, M.T.; Weiss, M.; Larsson, K.H. (2013). Towards a unified paradigm for sequencebased identification of fungi. *Molecular Ecology* 22: 5271–5277.
- Taboada, J. K. Miranda, T.M.; Melo, R.S.P.; Coelho-de-Sousa, G.C. (2022). Usos e conservação de espécies e ecossistemas nativos para o fortalecimento da sociobiodiversidade no território do PAN Lagoas do Sul. *Cadernos de Agroecologia*, v. 17, n. 3.
- Tabarelli, M.; Leal, I. R.; Scarano, F. R.; Silva, J. M. C. (2017). "The future of the Caatinga" In: Silva, J. M. C.; Leal, I. R.; Tabarelli, M. (eds.) *Caatinga. The largest tropical dry forest region in South America*. Cham: *Springer International Publishing*, p. 461-474.
- Tamura K.; Stecher G.; Kumar, S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022–3027.
- Tamura K.; Stecher G.; Kumar, S. (2015) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 33, Issue 7, July 2016, Pages 1870–1874.
- Largent, D.L. (1986). How to identify mushrooms to genus I. Macroscopic features. *Mad River Press*, USA.
- Largent, D. L. (1994). Entolomatoid fungi of the western United States and Alaska. *Mad River Press*, USA.
- Largent, D.L.; Henkel, T.W.; Aime, M.C.; Baroni, T.J. (2008). *Entolomataceae* of the Pakaraima Mountains of Guyana I: four new species of *Entoloma* s. str. *Mycologia* 100: 132–140.

- Lima, A.; Capobianco, J.P. (1997). Mata Atlântica: avanços legais e institucionais para sua conservação. Documentos ISA. São Paulo, *Instituto Socioambiental*, n.4.
- Guimarães, j. R.; Cordeiro, L. S.; Araújo, e. C. O.; Silva, I. R.; Gonçalves, R. J. S. (2017). Seleção de fungos filamentosos do bioma caatinga para a produção de quitinase, p. 1145-1150. In: anais do xii congresso brasileiro de engenharia química em iniciação científica [=blucher chemical engineering proceedings, v. 1, n.4]. Issn impresso: 2446-8711. São paulo: blucher.
- Magurran, A.E. (2004). Measuring Biological Diversity. *Blackwell Science Ltd*, Oxford.
- Magnago, A.C.; Furtado, A.N.M.; Valência, S.U.; Freitas, A. (2015). New records of agaricoid fungi (Basidiomycota) from Paraíba, Brazil. *Biotemas*, 28 (4): 9-2.
- Montecchio, L.; Rossi, S.; Courty, P.E.; Garbaye, J., (2006). *Entoloma nitidum* Qué. + *Carpinus betulus* L. *Descriptions of Ectomycorrhizae* 9/10, 31–36.
- Morozova, O.V.; Noordeloos, M.E.; VILA, J., (2014). *Entoloma* subgenus *Leptonia* in boreal-temperate Eurasia: towards a phylogenetic species concept. *Persoonia*: 32, 2014: 141–169.
- Milne, I.; Wright, F.; Rowe, G.; Marshal, D.F.; Husmeier, D.; McGuire, G. (2004). TOPALi: Software for Automatic Identification of Recombinant Sequences within DNA Multiple Alignments. *Bioinformatics*. 20 (11), 1806-1807.
- Noordeloos, M.E. (1981). *Entoloma* subgenera *Entoloma* and *Allocybe* in the Netherlands and adjacent regions with a reconnaissance of their remaining taxa in Europe. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. Volume 11 - Issue 2 p. 153- 256.
- Gates, G.M.; Noordeloos, M.E. (2007). Preliminary studies in the genus *Entoloma* in Tasmania - II. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 19. 157-226.
- Noordeloos, M.E., GATES, G.M. (2012). The *Entolomataceae* of Tasmania. *Fungal Diversity Research Series* 22, 3–400.
- Putzke, J.; Putzke, M. T. L. (1998). Os Reinos dos Fungos. *Edunisc*, Santa Cruz do Sul.
- Pinto, L.P. (2014) Status e os novos desafios das unidades de conservação na Amazônia e Mata Atlântica. In: Lima, G.S.; Almeida, M.P.; Ribeiro, G.A. (Orgs.). *Manejo e conservação de áreas protegidas*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 41-58.
- Romagnesi. H.; Gilles, G. (1979). Les Rhodophylles des forêts côtières du Gabon et de la Côte d'Ivoire avec une introduction générale sur la taxonomie du genre. Beihefte *Nova Hedwigia* 59: 1–649.
- Ronquist, F.; Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes: Bayesian Phylogenetic Inference under Mixed Models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- Ribeiro, M. S., Nascimento, L. A. G., Wartchow, F.; Silva, B. D. B. da. (2023). Primeiro Registro de *Entoloma wednae* V. Coimbra & Wartchow (Agaricales, Basidiomycota), para o Estado da Bahia, Brasil. *Hoehnea*, 50, e302023.
- Santos, L.D., Schlindwein, S. L.; Fantini, A. C.; Henkes, J.A.; Belderrain, M.C.N. (2020) Dinâmica do desmatamento da mata atlântica: causas e consequências. *Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental*, 9(3), 378-402.

- Silva, J. M. C.; Tabarelli, M.; Fonseca, M. T.; Lins, L. V. (org). (2004). Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Brasília (DF): MMA/UFPE/Conservation International – *Biodiversitas* – Embrapa Semi-árido. 382p.
- Silva-Filho, A.; Teixeira-Silva, M.; Cortez, V. (2018). New species, new combination, and notes on *Clitocella* and *Rhodocybe* (*Entolomataceae*) from Paraná State, Brazil. *Darwiniana*. 6. 58-67. 10.14522/darwiniana.2018.61.775.
- Smith, S.L.; Read, D.J. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. 3th ed. New York: Academic Press.
- Wartchow, F.; Maia, L.; Auxiliadora, M.; Cavalcanti, Q. (2011). New records of Agaricales from Atlantic Forest fragments of Pernambuco, Northeast Brazil. *Mycotaxon*. 118. 137-146.
- Singer, R. (1986). The Agaricales in Modern Taxonomy. Chicago, *Mycologia*.
- Wartchow, F.; Braga-Neto, R. (2019). A second record of *Entoloma azureoviride* (Agaricales, Basidiomycota) from Brazilian Amazon. *Hoehnea*. 46.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications. *Academic Press*, New York, p. 315–322.
- Varjabedian, R. (2010). Lei da Mata Atlântica: retrocesso ambiental. *Estudos avançados* 24 (68).
- Voitk, Andrus; Thorn, R. G.; Gulden, G.; Boyle, M.; Aarnæas J.O. (2013). *Entoloma parasiticus* & *E. pseudoparasiticus*: Parasites or pseudoparasites. *Omphalina*. 4. 11-12.
- Vilgalys, R.; Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.

Apêndice – A: Artigo Submetido para o periódico Fungal Systematics and Evolution

***Entoloma hygropileum* (Entolomataceae, Basidiomycota), uma nova espécie inesperada de calidermatoide de uma floresta úmida montanhosa no bioma Caatinga**

L.S. Firmino^{1*}, R. Koroiva², F. Wartchow³

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, CEP 50760-420, Recife, PE, Brazil.

² Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, CEP 66075-110, Belém, PA, Brazil.

³ Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Departamento de Sistemática e Ecologia, 58051-900, João Pessoa, PB, Brazil.

Autor correspondente: leonardo.lfs@ufpe.br

Resumo: Uma nova espécie de *Entoloma* subg. *Entoloma* é descrito em um fragmento florestal no nordeste do Brasil. A descrição da espécie é baseada na caracterização macro e microanatômica dos basidiomas e em análises filogenéticas moleculares da região ITS e 28S LSU do DNA ribossômico nuclear. *Entoloma hygropileum* sp. nov. distingue-se pelo hábito tricolomatóide a um tanto clitocibóide com píleo acastanhado muito úmido a quase viscoso e glabro, lamelas amplamente adnadas com dentes subdecorrentes, estipe proporcionalmente curto, basidiósporos isodiamétricos a subisodiamétricos 6,8–8,6 × 6,1–7,6 μm, ausência de cistídios himeniais e um Pileipellis calidérmica. A espécie mais semelhante é *Entoloma djaense*, que difere principalmente no estipe proporcionalmente muito mais longo e na fixação das lamelas.

Palavras-chave: Agaricales, Agaricomycetes, Neotrópico, sistemática, taxonomia.

INTRODUÇÃO

Entoloma sect. *Calliderma* foi descrito como uma seção de *Rhodophyllus* por Romagnesi (1941: 45) correspondendo a espécies com píleo cônico-umbonato e uma pileipellis (uma paliçada com elementos fusiformes contínuos e subpellis (ou seja, hipoderme com hife vagamente entrelaçada), com *R. callidermus* como tipo espécie (Romagnesi 1956). Mais tarde, Noordeloos (1983) transferiu esta seção para *Entoloma*, e então Largent (1994) ergueu esta seção como o gênero *Calliderma*. Finalmente, Noordeloos; Gates (2012) e Morgado et al. (2013) confirmaram que *Calliderma* pertence a um clado integral correspondente ao subgênero *Entoloma*.

Coimbra (2014) compilou 271 espécies de *Entolomataceae* ocorrendo em países da América Central e do Sul, das quais mais de 100 apenas do Brasil e da Guiana e cinco táxons tratados sob *Calliderma*. Nos últimos anos, novos registros para o gênero têm sido feitos na região Nordeste deste país (Wartchow 2006, Wartchow et al. 2011, Alves; Nascimento 2012, Coimbra et al. 2013). Em relação aos táxons com pillipellis callidermatóide, Dennis (1953), Horak (1977, 1982, 1983), Karstedt; Capelari (2010, como *Calliderma*), Aime et al. (2010, como *Calliderma*), Wartchow et al. (2011) e Coimbra et al. (2013) relataram os seguintes

táxons (ver novas combinações e nomes em Blanco-Dios 2015): *Entoloma brasiliensis*, *E. caeruleosplendens*, *E. foldatsii*, *E. ipirangaennsis*, *E. obtusisporum*, *E. peculiare*, *E. pruinatocutis*, *E. pruinatum* e *E. tucuchense* da Argentina, Brasil, Guiana e Venezuela.

Neste estudo, uma espécie morfologicamente semelhante a *E. djaense* (originalmente tratada como pertencente ao grupo callidermatoide por Largent *et al.* 2020) foi encontrada em uma região montanhosa com enclaves de florestas úmidas circundadas pela Caatinga (chamada de ‘brejo de altitude’). No entanto, descobrimos que corresponde a um táxon não descrito, e descrições macro e microscópicas, bem como dados de análise filogenética são apresentados para as novas espécies aqui descritas.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição do Local

O 'Parque Estadual Mata do Pau-Ferro' é uma floresta de 'brejo de altitude' localizada no Nordeste do Brasil, em altitude de até 600 metros acima do nível do mar, com vegetação predominantemente de floresta tropical (Andrade *et al.* 2006, Oliveira *et al.* 2006). Na região, as famílias mais importantes são *Rubiaceae*, *Malvaceae*, *Asteraceae*, *Convolvulaceae*, *Solanaceae* e *Fabaceae* (Barbosa *et al.* 2004). Esta floresta, embora corresponda a uma Unidade de Conservação, sofre elevado grau de efeito de borda (Campos *et al.* 2018, Marques *et al.* 2019).

Estudos morfológicos

Descrições de características macromorfológicas e fotografias foram feitas a partir de material fresco. As cores foram descritas subjetivamente e codificadas de acordo com Kramer (2004), com códigos de cores anotados entre parênteses. Os basidiomas secos foram seccionados e reidratados em KOH 3% e água, e corados com Vermelho Congo. Os basidiósporos eram medidos excluindo o apêndice hilar e os basídios excluindo os esterigmas. Um microscópio biológico binocular Zeiss Primo Star com câmera embutida e software de imagem ZEN 3.1 foi utilizado para obter as micrografias. A análise microscópica segue Largent (1994). Nas descrições taxonômicas, “x =” refere-se às dimensões médias das estruturas, “Q” refere-se ao quociente médio do comprimento das estruturas dividido pela sua largura. O holótipo está depositado no Herbário JPB (Herbário Lauro Pires Xavier, Universidade Federal da Paraíba).

Extração e sequenciamento de DNA

Para confirmar a identificação dos nossos espécimes, o DNA genômico total de um espécime foi extraído usando o DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Alemanha). Amplificações por PCR foram feitas para espaçadores transcritos internos completos 1 e 2 e o rDNA 5.8S (nuc-ITSrDNA) delimitado pelos primers ITS7 e ITS8 (Dentinger *et al.* 2010) e gene 28S rDNA delimitado pelos primers LR0R e o primer reverso LR7 (Moncalvo e outros 2000). As

condições de PCR para amplificação consistiram em tampão 1×, dNTP a 0,2 mM, cada primer a 0,2 µM, MgCl₂ a 2 mM, 1U Taq polimerase e 2 µl de DNA molde, em um volume total de reação de 25 µl. O programa de ciclagem de PCR foi utilizado para ambos os conjuntos de primers: 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 51°C por 40 s e 72°C por 1 min e concluindo com 10 min. extensão a 72°C. Os produtos de PCR foram sequenciados bidirecionalmente no ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Análises de dados

Utilizamos o BioEdit v. 7.2.5 (Hall 1999) para verificar a qualidade da sequência das cadeias por comparação com seus respectivos cromatogramas e para montar e editar se necessário. As sequências foram comparadas com similares e disponíveis no banco de dados GenBank ([//www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) usando o algoritmo BLASTn. Sequências de *Entoloma* presentes no GenBank foram incorporadas para análise de ambas as regiões genéticas, 29 sequências de LSU e 19 sequências ITS. Em nossa análise, incluímos sequências de rDNA 28S com mais de 400 pb. Além disso, a fim de aumentar a robustez na declaração de homologia e elevar a ocupação da matriz, longas sequências de nuc-ITSrDNA foram truncadas para cobrir apenas esta região.

Na análise filogenética, as sequências foram alinhadas usando MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), um módulo implementado no software MEGA v. 7.0.26 usando o algoritmo GTR+G. A análise de máxima parcimônia (MP) foi conduzida usando PaupUp v. 4.0b10 (Swofford 2002) com 1000 réplicas de bootstrap heurísticas, usando adição aleatória passo a passo e mantendo uma árvore em cada etapa. Maxtrees foram definidos para 1000, o algoritmo de troca de ramificação TBR foi usado para avaliar o suporte de ramificação. Árvores de máxima verossimilhança (ML) com RAxML v. 8.2.12 (Stamatakis 2014) usando o modelo GTR GAMMA I com 1.000 réplicas de bootstrap do MEGA v. Uma análise Bayesiana (PP) foi construída com MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist; Huelsenbeck 2003) lançada a partir de TOPALi v. O melhor modelo de evolução disponível foi selecionado com jModel Test v. 3.0.4 (Posada 2008) (nuc-ITSrDNA, GTR+G; 28S rDNA, GTR+I+G). Dois paralelos independentes foram executados, amostrando a cada 1.000 gerações para um total de 106 milhões de gerações pelo TOPALi v. 2.5, com um valor de queima de 25%. As sequências geradas neste estudo LSU e ITS foram depositadas no GenBank (NCBI) sob os acessos OR365603 e OR365604 respectivamente.

RESULTADOS

Análise filogenética

Com base em uma pesquisa BLAST do banco de dados de nucleotídeos GenBank do NCBI usando a sequência ITS e LSU, os acertos mais próximos foram *E. djaense*, [GenBank MN066547, identidade de sequência LSU = 869/933 (93,14%); MN069539, identidade de sequência ITS = 530/650 (81,54%)] e *E. olivaceo coloratum* [GenBank KT339287, identidade de sequência LSU = 722/815 (88,59%); KT339257, identidade de sequência ITS = 168/176 (95%)]. A filogenia usando código de barras ITS e LSU (Figs. 1, 2) também mostrou alta

similaridade em todas as análises MP, ML e BI, com bootstrap bem suportado (BS) com nó 97/100/0,99 (Fig. 1), com *E. hygropileum* e *E. djaense* no mesmo ramo. Se considerarmos todos os ramos incluindo *E. olivaceocoloratum* o nó é mais suportado 100/100/0,99 (Fig. 2). Árvores filogenéticas foram construídas para todas as análises e apresentaram topologia semelhante para a análise Bayesiana, que foi escolhida para plotagem dos dados. As árvores foram depositadas no TreeBASE sob o número de estudo 30942.

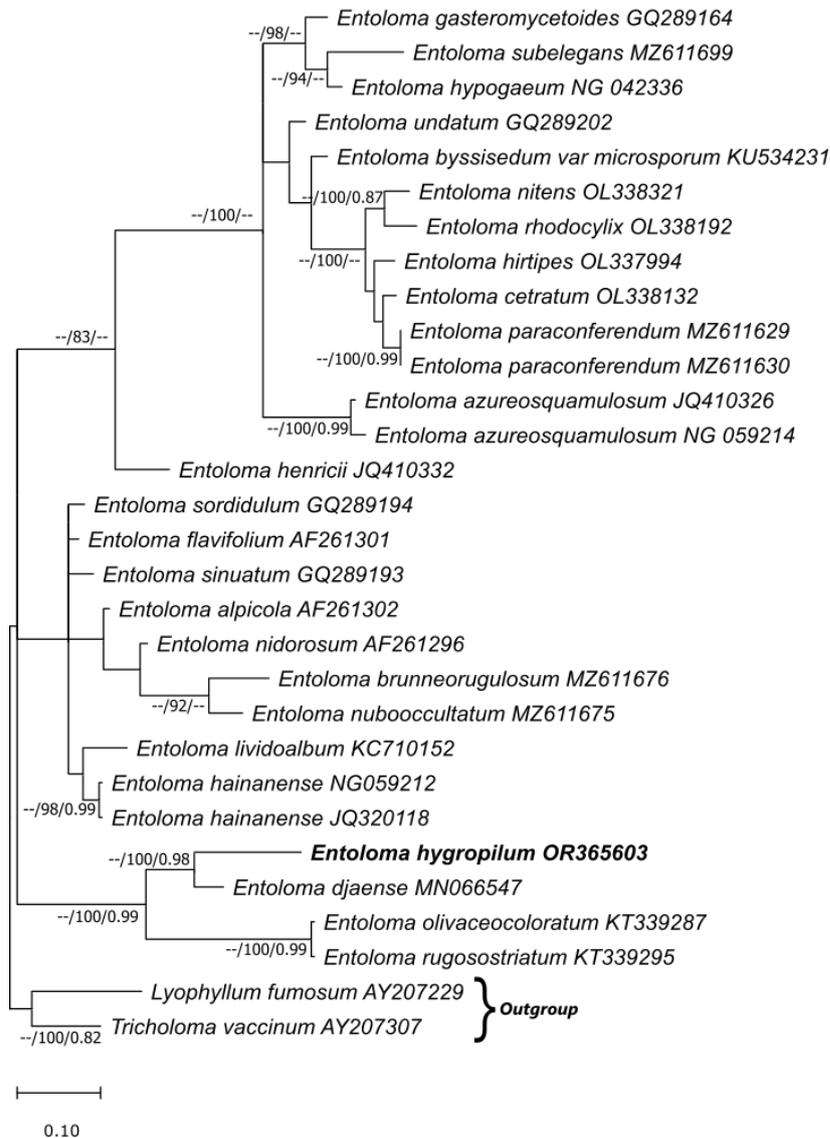


Figura 1. Árvore filogenética derivada da análise Bayesiana, baseada em dados da região nrLSU. Os valores são somados nos nós ($\geq 75\%$ para bootstrap ML / $\geq 75\%$ para bootstrap MP / $\geq 0,75$ para probabilidade posterior de BI, respectivamente). A barra de escala representa o número de alterações de nucleotídeos por local. Tipo de espécie em T (itálico maiúsculo). A nova espécie está em negrito e itálico.

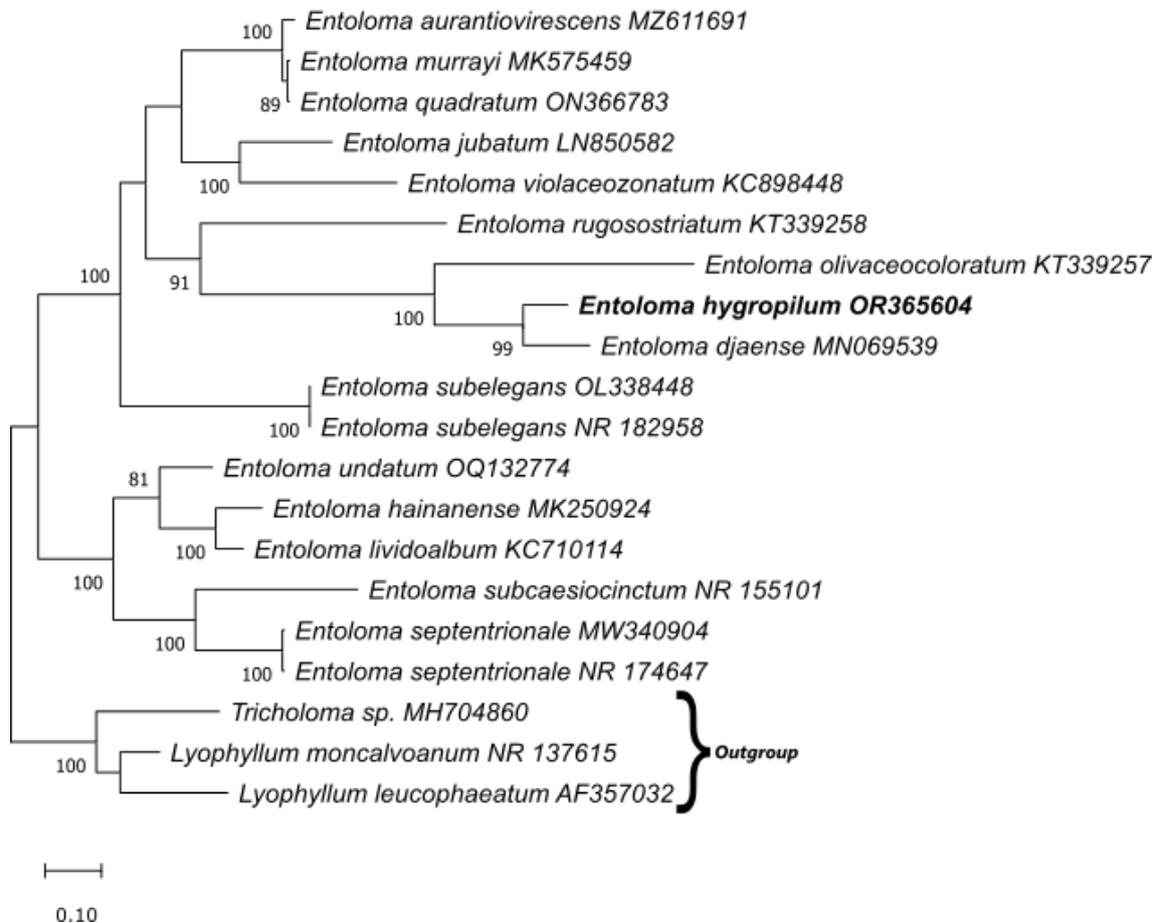


Figura 2. Árvore filogenética derivada da análise Bayesiana, baseada nos dados das regiões ITS1 e ITS2. Os valores são somados nos nós ($\geq 75\%$ para bootstrap ML / $\geq 75\%$ para bootstrap MP / $\geq 0,75$ para probabilidade posterior de BI, respectivamente). A barra de escala representa o número de alterações de nucleotídeos por local. Tipo de espécie em T (itálico maiúsculo). A nova espécie está em negrito e itálico.

Tabela 1. Informações sobre táxons e números de acesso ao GenBank de sequências ITS de espécimes de *Entoloma* utilizados nas análises filogenéticas moleculares. O asterisco (*) corresponde que o DNA foi extraído do holótipo da espécie.

Espécies	Voucher	País de Origem	Numeros de Acesso GenBank (ITS, 5.8S)
<i>E. hainanense</i>	MHHNU 30694	China	MK250924
<i>E. olivaceocoloratum</i>	TH8855	Guiana	KT339257
<i>E. rugosostriatum</i>	TH6766	Guiana	KT339258
<i>E. subelegans</i>	WU32903	Alemanha	OL338448

<i>E. subelegans</i> (Holótipo)	WU:32901	Ilhas Maurício	NR_182958
<i>E. undatum</i>	-	USA	OQ132774
<i>E. djaense</i>	TH10608	Camarões	MN069539
<i>E. hygropileum</i> (Holótipo)	FW 15/2019	Brasil (Este estudo)	OR365604
<i>E. lividoalbum</i>	MEN 200328	Holanda	KC710114
<i>Entoloma murrayi</i>	SDR NAMA 2017-160	USA	MK575459
<i>Entoloma quadratum</i>	iNAT:16890676	USA	ON366783
<i>Entoloma aurantiovirescens</i>	PAN419	Panama	MZ611691
<i>E. jubatum</i>	373/11	Finlândia	LN850582
<i>E. violaceozonatum</i>	L275	Estônia	KC898448
<i>E. subcaesiocinctum</i> (Holótipo)	SAAS 133	China	NR_155101
<i>E. septentrionale</i>	O:F-254295	Noruega	MW340904
<i>E. septentrionale</i> (Holótipo)	O:F-254295	Noruega	NR_174647
<i>Tricholoma sp.</i>	CLO4711	USA	MH704860
<i>Lyophyllum leucophaeatum</i>	Hae251.97	-	AF357032
<i>L. moncalvoanum</i> (Holótipo)	PDD:96328	Nova Zelândia	NR_137615

Tabela 2. Informações sobre táxons e números de acesso ao GenBank de sequências LSU de espécimes de *Entoloma* usadas nas análises filogenéticas moleculares. O asterisco (*) corresponde que o DNA foi extraído do holótipo da espécie.

Espécies	Voucher	País de Origem	Números de Acesso GenBank (nrLSU)
<i>Entoloma hygropileum</i> (Holotype)	FW 15/2019	Brasil (Este estudo)	OR365603
<i>Lyophyllum fumosum</i>	GLM 45953	Alemanha	AY207229
<i>Tricholoma vaccinum</i>	GLM 46037	Alemanha	AY207307

<i>E. gasteromycetoides</i>	E2031	Holanda	GQ289164
<i>E. byssisedum</i> var. <i>microsporum</i>	SAAS1160	China	KU534231
<i>E. djaense</i>	TH10608	Camarões	MN066547
<i>E. brunneorugulosum</i>	KaiR691	Panamá	MZ611676
<i>E. hainanense</i> (Type)	GDGM:27990	China	NG059212
<i>E. sordidulum</i>	-	Bélgica	GQ289194
<i>E. undatum</i>	-	Bélgica	GQ289202
<i>E. paraconferendum</i>	CME6	Panamá	MZ611629
<i>E. nidorosum</i>	TB6263	-	AF261296
<i>E. alpicola</i>	TB6415	-	AF261302
<i>E. nubooccultatum</i>	KaiR687	Panamá	MZ611675
<i>E. olivaceocolorum</i>	TH8855	Guiana	KT339287
<i>E. azureosquamulosum</i>	HKAS 53408	China	JQ410326
<i>E. azureosquamulosum</i> (Type)	GDGM:27355	China	NG059214
<i>E. subelegans</i>	WU32902	Ilhas Mauricio	MZ611699
<i>E. nitens</i>	MD2018-09	Alemanha	OL338321
<i>E. flavifolium</i>	TB6215	-	AF261301
<i>E. hirtipes</i>	aFP4	Alemanha	OL337994
<i>E. hypogaeum</i> (Type)	TNS:F-46869	-	NG042336
<i>E. rugosostriatum</i>	TH9136	Guiana	KT339295
<i>E. paraconferendum</i>	CME7	Panamá	MZ611630
<i>E. cetratum</i>	KaiR932	Áustria	OL338132
<i>E. hainanense</i>	GDGM 27990	China	JQ320118
<i>E. rhodocylix</i>	KaiR1311	Áustria	OL338192
<i>E. sinuatum</i>	-	Holanda	GQ289193
<i>E. lividoalbum</i>	MEN 200328	-	KC710152
<i>E. henricii</i>	HKAS 63414	China	JQ410332

Taxonomia

Entoloma hygropileum L. Firmino & Wartchow, **sp. nov.** Figs 3–5
 MycoBank: MB851355

Tipo: **Brazil**, Paraíba, Areia, Parque Estadual Mata do Pau-Ferro, Trilha do Cumbe, 24 Jul 2019, *F. Wartchow FW 15/2019* (JPB 65667, **holotypus hic deignatus!**)

Etimologia: do Grego *hygro* (= úmido, molhado) e *pilum* (= tampa, pileus); devido a superfície do píleo muito úmida.



Figura 3. *E. hygropileum* (Holótipo). De a-d muitas vistas do basidioma. Escalas a-d= 20 mm.

Basidioma pequeno e robusto, tricolomatóide a ligeiramente clitocibóide. Píleo 42 mm, plano-convexo, marrom (OAC 722) depois mais escuro (OAC 727) às vezes marrom acinzentado (mais escuro que OAC 768) ou com tons amarelos (OAC 803) no centro; superfície lisa, muito úmida a quase viscosa, glabra e brilhante; contexto com 4 mm de espessura, branco aquoso, imutável; odor levemente adocicado. Lamelas amplamente adnadas com dente decorrente curto, creme (OAC 815) a salmão (OAC 655), distante, 5 mm de largura; borda inteira, concolor nas laterais; lamélulas freqüentes, com comprimentos diversos,

atenuadas. Estipe 30×5 mm, excêntrico, creme, superficial, aparentemente longitudinal, muito levemente, escamoso comprimido, glabro; contexto esbranquiçado, imutável, sólido.

Basidiósporos $6,8-8,6 \times 6,1-7,6$, ($\bar{x} = 7,6 \pm 0,5 \times 7,1 \pm 0,4$ μm ; $Q = 1,00-1,20$; $Q = 1,10 \pm 0,3$), isodiamétrico a às vezes subisodiamétrico, angular com 5 a 6 ângulos rombos, rosado pálido, paredes ligeiramente espessas; conteúdo como grande gutule; apêndice hilar cônico, sublateral. Basídios $34,6-50,9 (-51) \times 7,1-9,7 (-10,2)$ μm ($\bar{x} = 40,9 \pm 4,4 \times 7,7 \pm 0,8$ μm ; $Q = 5,3 \pm 0,3$) clavados principalmente delgados a às vezes subcilíndricos, hialinos, de paredes finas, com 4 sterigmata variando até 3 μm de altura. Pleurocistídios e queilocistídios ausentes. Lamelas trama regulares, com hifas hialinas estreitas de larguras variáveis, conexões em pinça presentes, $16,6-61,7 \times 3,9-8,8$ μm . Pileipellis callidermic, duas camadas variando até 55 μm de espessura; suprapellis com 15 μm de espessura feito de pieocistídios versiformes de cor clara espalhados até $14-40 \times 10-15$ μm , lageniformes a ventricosos ou sacados, às vezes subcilíndricos, de paredes finas, não incrustados; subpellis com 30 μm de espessura com hifas de células curtas infladas mais compactas com cerca de 5 células de profundidade $7,5-12,7 \times 6,1-9,2$ μm , também pálidas incolores e células infladas versiformes e hifas um tanto radialmente orientadas, não incrustadas. Caulocistídios muito ocasionais $4,9-10,8 \times 2,4-5,9$ μm , clavados, pigmentados claros, paredes finas. Estipe trama com hifas orientadas longitudinalmente de comprimentos variáveis $29,4-63,7 \times 3,9-10,7$ μm , subparalelas. Hifas oleíferas e glóbulos lipídicos ausentes. Pigmentação citoplasmática, não incrustada. Conexões de pinça comumente encontradas em todos os tecidos examinados.

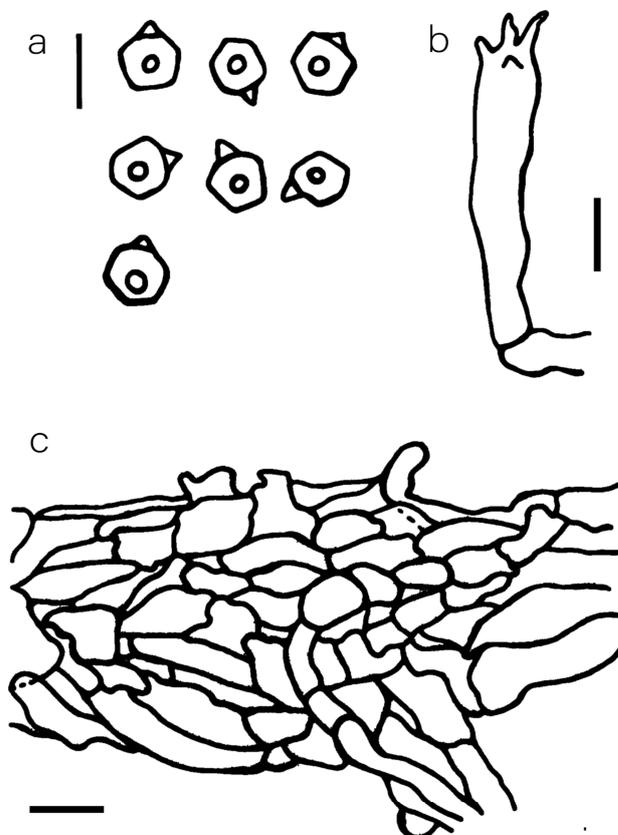


Figura 4. *E. hygropileum* (Holótipo). a. Basidiósporos. b. Basídia. c. Pileipellis com elementos inflados. Barras de escala: a = 10 μm ; b;c = 20 μm . Fotos Felipe Wartchow; ilustrações de Leonardo Firmino.

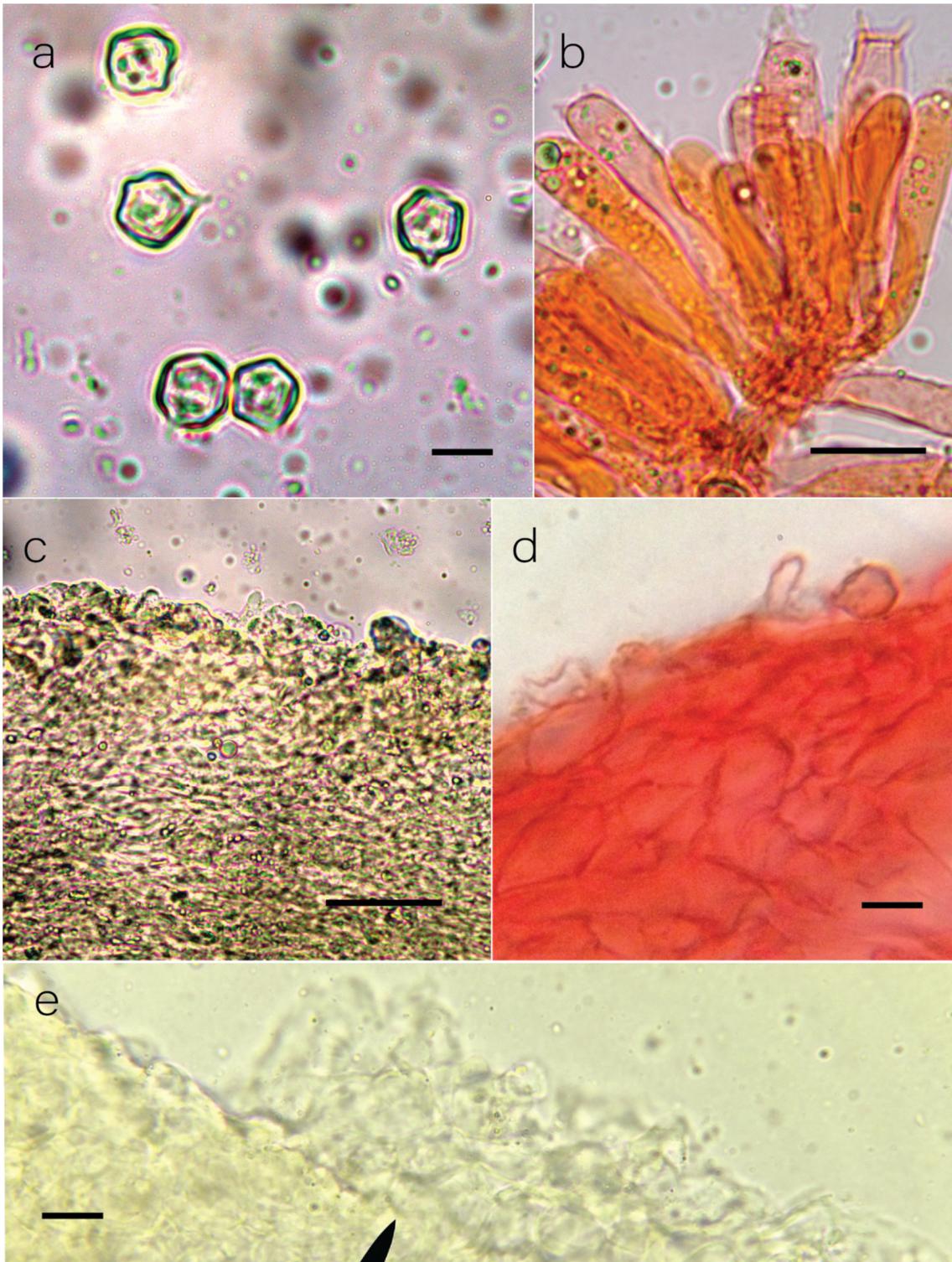


Figura 5. *E. hygropileum* (Holótipo). a. Basidiósporos. b. Basídia. c. Disposição das hifas de contexto do píleo. d. Pileipellis com elementos inflados. e. Suprapellis com células. Barras de escala: a = 10 μm ; b;c = 20 μm . Fotos de Leonardo Firmino.

Hábito e habitat: Solitário no solo entre serapilheira em mata de brejo de altitude.

Distribuição conhecida: Conhecida apenas na localidade-tipo.

Comentários sobre o estado de conservação: A nova espécie foi coletada em uma unidade de conservação com alto grau de intervenção humana ilegal (Barbosa *et al.* 2017) e não existe plano de manejo para este parque (Pereira *et al.* 2019, Campos; Lima 2020). Além disso, há relatos de que os efeitos de borda resultantes da perda de habitat ultrapassam os 50 m no gradiente fronteira-interior (Campos *et al.* 2018, Marques *et al.* 2019). No entanto, os dados sobre a população e abundância de *E. hygropileum* são limitados e apenas pesquisas futuras mostrarão a classificação apropriada de ameaça. Assim, sugerimos aqui a categoria de dados deficientes (DD) antes de confrontá-la com os critérios de status de ameaça da IUCN (2022).

DISCUSSÃO

Entre as espécies calidermatóides de *Entoloma*, a nova espécie é caracterizada pelo hábito tricolomatóide a quase cliticobóide com píleo acastanhado muito úmido a quase viscoso e glabro, lamelas amplamente adnadas com dentes subdecorrentes, estipe proporcionalmente curto, basidiósporos isodiamétricos a subsodiamétricos $6,8\text{--}8,6 \times 6,1\text{--}7,6$ μm , ausência de cistídios himeniais, pilipelis calidérmica (*sensu* Largent *et al.* 2020) e presença de conexões de pinça.

E. djaense crescendo em uma floresta monodominante contendo *Gilbertiodendron dewevrei* (Fabaceae) dos Camarões, é a única espécie conhecida com características muito semelhantes. Compartilha o píleo liso, úmido e brilhante, os basidiósporos isodiamétricos, a presença de conexões em pinça e a pilipelis estruturalmente calidérmica muito semelhante, com o subpelis apresentando pigmentação pouco oliva e células mais achatadas. No entanto, os pieocistidídios mais frequentes e os suprapelis com presença de elementos inflados maiores $16\text{--}32,4 \times 9,3\text{--}24,2$ μm em *E. djaense* o diferenciam de *E. hygropileum*. Além disso, o estipe proporcionalmente muito mais longo e a fixação das lamelas da entidade africana, ou seja, sinuosa superficialmente com dente decorrente, também ajudam a segregar esta entidade para a nossa nova espécie (Largent *et al.* 2020). Estas combinações da estrutura pilleipelis observadas em *E. djaense* e *E. hygropileum* parecem pouco frequentes entre *Entoloma*, e concordamos com Largent *et al.* (2020) considerando ambas as espécies como portadoras de pillipellis callidermatóide. Além disso, nossa filogenia usando código de barras ITS e LSU também mostrou alta similaridade em ambas as análises, com bootstrap bem suportado.

A outra espécie descrita com píleo viscoso quando úmido e de cor marrom, basidiósporos isodiamétricos e uma 'paliçada tricolorial aglutinada' é o *Entoloma entolomatoides* neotropical da Martinica e Dominica (Pegler 1983 como *Inopilus entolomoides*). No entanto, este táxon difere na conta do píleo maior com 40–75 (–90) mm de diâmetro, estipe mais largo com 50–10 mm de espessura e basidiósporos maiores com $8,5\text{--}10,5 \times 7\text{--}9,5$ μm (Pegler 1983). Mais tarde, Karstedt; Capelari (2010, como *Caliderma*) considerado sinônimo de *Entoloma pruinatocutis* após análise microscópica de precisão.

Entoloma canthareluloides também da Paraíba compartilha com *E. hygropillum* nas lamelas decorrentes e nos basidiósporos isodiamétricos. No entanto, o píleo subvelutino a subglabro sem menção de viscosidade com tonalidades acinzentadas-fuligíneas contrastando

com o estipe esbranquiçado e depois amarelado, e o pileipellis a cutis com hifas estreitas separam esta espécie de *E. hygropileum* (Singer 1965).

Entoloma wednae de Pernambuco compartilha lamelas decorrentes, basidiósporos isodiamétricos, pileipellis dividida em duas camadas e hábito de floresta montanhosa. Porém difere na superfície, textura e cor do píleo, bem como na ausência de elementos inflados no píleo (Coimbra *et al.* 2013).

Análise bayesiana de clusters nrLSU *E. hygropileum* sp. nov. e *E. djaense* em um ramo formando um clado com duas sequências adicionais neotrópicas de *Entoloma* subg. *Entoloma* viz., *Entoloma olivaceocoloratum* e *Entoloma rugosostriatum*. Correspondem a espécies com hábito tricolomatóide robusto, subisodiamétricos a esporos isodiamétricos e pileipellis a cutis (Largent *et al.* 2008). Além disso, pelo menos em *Entoloma rugosostriatum* também observamos uma superfície úmida do píleo. Na verdade, a análise ITS também agrupou as novas espécies com sequências correspondentes às mesmas espécies mencionadas acima, confirmando a sua afinidade filogenética.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem gentilmente à Dra. Rivete S. Lima ('Laboratório de Anatomia Vegetal'-UFPB) pela ajuda na criação de microfotos. O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) é reconhecido por financiar os seguintes projetos: 'Programa de Pesquisas em Biodiversidade' (PPBio Proc. 60/2009), 'Fungos agaricoides em áreas de Mata Atlântica e Caatinga no Estado da Paraíba' (Edital Universal Proc. 420.448/2016-0) e 'Produtividade em Pesquisa' para FW (Proc. 307922/2014-6, Proc. 307947/2017-3 e Proc. 309652/2020-0). Agradecemos também à Universidade Federal da Paraíba, reconhecida pelo financiamento deste projeto através da Chamada Interna Produtividade em Pesquisa (PROPESQ/UFPB Nº 06/2021 Cód. PVA13212-2020). RK recebeu apoio financeiro (BLD-PDRP) nº 2022/2023 da 'Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba' (FAPESQ).

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver interesses conflitantes e enfatizam que todos contribuíram para a concepção deste estudo.

REFERÊNCIAS

- Aime MC, Largent DL, Henkel TW, *et al.* (2010). The *Entolomataceae* of the Pakaraima Mountains of Guyana IV: new species of *Calliderma*, *Paraeccilia* and *Trichopilus*. *Mycologia* **102**: 633–649.
- Alves MH, Nascimento CC (2012). *Entoloma virescens* (Sacc.) E. Horak ex Courtec. , 1986, (Agaricales: Entolomataceae): the first record for the Caatinga Biome, Ceará, Brazil. *Check List* **8**: 577–580.
- Andrade LA, Oliveira FX, Nascimento IS, *et al.* (2006). Análise florística e estrutural de matas ciliares ocorrentes em brejo de altitude no município de Areia, Paraíba. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* **1**: 31–40.

- Barbosa MRV, Agra MF, Sampaio EVSB, *et al.* (2004) Diversidade florística na Mata do Pau-Ferro, Areia, Paraíba. In: *Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba. História 6, Ecologia e Conservação* (Pôrto KC, Cabral JJP, Tabarelli M, eds). Ministério do Meio Ambiente, Brazil: 111–122.
- Barbosa ETG, Marques AL, Neri UBD, *et al.* (2017). Geoconservação em brejos de altitude: Parque Estadual Mata do Pau-Ferro. *Natureza e Conservação* **10**: 1–16.
- Blanco-Dios JE (2015). Nota sobre el género *Entoloma* s.l. en el noroeste de la Península Ibérica (VII): nuevas combinaciones y nuevos nombres. *Tarrelas* **17**: 32–38.
- Campos JO, Lima VRP (2020). Proposta de zoneamento ambiental para o Parque Estadual Mata do Pau-Ferro, Paraíba, Brasil. *Physis Terrae* **2**: 19–46.
- Campos JO, Santos J S, Salvador MSS, *et al.* (2018). Análise e propagação dos efeitos de borda no Parque Estadual Mata do Pau-Ferro, Areia-PB. *Revista Geográfica Acadêmica* **12**: 21–36.
- Co-David, D., Langeveld, D. and Noordeloos, M.E. (2009). Molecular phylogeny and spore evolution of Entolomataceae. *Persoonia* **23**, 147-176.
- Coimbra VRM (2014). Checklist of Central and South American *Agaricales* (*Basidiomycota*) I: *Entolomataceae*. *Mycosphere* **5**: 475–487.
- Coimbra VRM, Wartchow F, Gibertoni TB (2013). Studies on *Entoloma* (*Agaricales*, *Basidiomycota*) in the Atlantic Forest, Northeast Brazil. *Nova Hedwigia* **97**: 139–157.
- Cooper JA (2014). New species and combinations of some New Zealand agarics belonging to *Clitopilus*, *Lyophyllum*, *Gerhardtia*, *Clitocybe*, *Hydnangium*, *Mycena*, *Rhodocollybia* and *Gerronema*. *Mycosphere* **5**: 263-288.
- Dennis RWG (1953). Les *Agaricales* de l’Ile de la Trinité: Rhodosporae-Ochrosporae. *Bulletin de la Société Mycologique de France* **69**: 145–198.
- Dentinger BTM, Margaritescu S, Moncalvo JM (2010) Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. *Molecular Ecology Resources* **10**: 628-633.
- Huelsenbeck, JP, Ronquist F (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**: 754–755.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–98.
- He X-L, Wang D, Peng H-W, Gan B-C (2017). Two new *Entoloma* s.l. species with serrulatum-type lamellar edge from Changbai Mountains, Northeast China. *Mycological Progress* **16**: 761–768.
- He, X.-L., Li, T.-H., Xi, P.-G., Jiang, Z.-D. and Shen, Y.-H. (2013). Phylogeny of *Entoloma* s.l. subgenus *Pouzarella*, with descriptions of five new species from China. *Fungal Divers.* **58** (1), 227-243.
- Hofstetter V, Clemençon H, Moncalvo J-M, Vilgalys R (2002). Phylogenetic analyses of the Lyophylleae (*Agaricales*, *Basidiomycota*) based on nuclear and mitochondrial rDNA sequences. *Mycological Research* **106**: 1043–1049.
- Horak E (1977). *Entoloma* in South America. I. *Sydowia* **30**: 40–111.
- Horak E (1982). *Entoloma* in South America. II. *Sydowia* **35**: 75–99.
- Horak E (1983). New taxa of *Entoloma* (sect. *Callidermi*) and *Pouzaromyces*. *Cryptogamie, Mycologie* **4**: 19–99,

- IUCN Standards and Petitions Subcommittee (2022). Guidelines for Using the IUCN Red List categories and Criteria. Version 15.1. Prepared by the Standards and petitions Subcommittee. <https://www.iucnredlist.org/resources/redlistguidelines>.
- Kinoshita, A., Sasaki, H. and Nara, K. (2012). Multiple origins of sequestrate basidiomes within *Entoloma* inferred from molecular phylogenetic analyses. *Fungal Biol* **116** (12), 1250-1262.
- Kramer LA (2004). *The Online Auction Color Chart*. Online Auction Color Chart Co., United States.
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**:1870-1874.
- Kokkonen K (2015) A survey of boreal *Entoloma* with emphasis on the subgenus *Rhodopolia*. *Mycological Progress* **14**: 116.
- Largent DL (1994). *Entolomatoid fungi of the Pacific Northwest and Alaska*. Mad River Press, United States.
- Largent DL, Henkel TW, Siegel N, *et al.* (2020). New species of Entolomataceae from Cameroon. *Fungal Systematics and Evolution* **5**: 151–167.
- Marques AL, Costa RCG, Moura DC (2019). Parque Estadual da Mata do Pau-Ferro (Areia-Paraíba): zona de amortecimento e áreas de conflito. *Geoambiente On-Line* **34**: 1–18.
- Milne I, Wright F, Rowe G, *et al.* (2004). TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics* **20**: 1806–1807.
- Moncalvo J-M., Lutzoni FM, Rehner SA, *et al.* (2000). Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* **49**: 278–305.
- Moncalvo, J.M., Vilgalys, R., Redhead, S.A., Johnson, J.E., James, T.Y., Catherine Aime, M., Hofstetter, V., Verduin, S.J., Larsson, E., Baroni, T.J., Greg Thorn, R., Jacobsson, S., Clemençon, H. and Miller, O.K. Jr. (2002). One hundred and seventeen clades of euagarics. *Mol. Phylogenet. Evol.* **23** (3), 357-400.
- Morgado LN, Noordeloos E, Lamoureux Y, *et al.* (2013). Multi-gene phylogenetic analyses reveal species limits, phylogeographic patterns, and evolutionary histories of key morphological traits in *Entoloma* (Agaricales, Basidiomycota). *Persoonia* **31**: 159–178.
- Morozova OV, Noordeloos ME, Vila J (2014). *Entoloma* subgenus *Leptonia* in boreal-temperate Eurasia: towards a phylogenetic species concept. *Persoonia* **32**: 141–169.
- Noordeloos ME (1983). Studies in *Entoloma* — 7. *Entoloma* sect. *Phlebophora*, sect. nov. *Persoonia* **12**: 75–79.
- Noordeloos ME, Lorås J, Eidissen SE, *et al.* (2020). Three new *Entoloma* species of the *Cyanula* clade (Entolomataceae, Agaricales) from (sub)alpine habitats in Northern Norway and Sweden. *Sydowia* **73**: 185–196.
- Ovrebo, C.L., Hughes, K.W. and Halling, R.E. (2019). Three new species of *Tricholoma* from Costa Rica. *Phytotaxa* **392** (1), 33-44.
- Oliveira FX, Andrade LA, Félix LP (2006). Comparações florísticas e estruturais entre comunidades de Floresta Ombrófila Aberta com diferentes idades, no Município de Areia, PB, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **20**: 861–873.

- Pegler DN (1983). Agaric lora of Lesser Antilles. *Kew Bulletin Additional Series* **9**: 1-668.
- Pereira TF, Campos JO, Pereira MRS, *et al.* (2019). Ecoturismo e os impactos ambientais no Parque Estadual Mata do Pau-Ferro, Areia, Paraíba. *Geotemas* **9**: 142–157.
- Posada D (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1253–1256.
- Reschke K, Noordeloos ME, Manz C, Hoffmann TA, Rodríguez-Caicedo J, Dima B, Piepenbring M, (2022a). Fungal diversity in the tropics: *Entoloma* spp. in Panama *Nolanea*. *Mycological Progress* **21**: 93–145.
- Reschke K, Morozova OV, Dima B, Cooper JA, Corriol G, Biketova AY, Piepenbring M, Noordeloos ME (2022b). Phylogeny, taxonomy, and character evolution in *Entoloma* subgenus *Nolanea*. *Persoonia* **49**: 136–170.
- Romagnesi H (1941). *Les Rhodophylles de Madagascar (Entoloma, Nolanea, Leptonia, Eccilia, Claudopus)*. Paris.
- Romagnesi H (1956). Les Rhodophylles du Congo Belge d'après les récoltes de Mme. Goossens-Fontana. *Bulletin du Jardin botanique de l'État a Bruxelles* **56**: 137–182.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.
- Singer R. 1965. Interesting and new agarics from Brazil. *Atas do Instituto de Micologia da Universidade do Recife* **2**: 15–59.
- Stamatakis A (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**: 1312–1313.
- Swofford DL, (2002). *PAUP**. *Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Walther, G., Garnica, S. and Weiss, M. (2005). The systematic relevance of conidiogenesis modes in the gilled. Agaricales. *Mycol. Res.* **109** (PT 5), 525-544.
- Wartchow F (2006). The Neotropical *Entoloma dragonosporum* (Agaricales, Basidiomycota): a new record from Northeast Brazil. *Biociências* **14**: 93–94.
- Wartchow F, Maia LC, Cavalcanti MAQ (2011). New records of Agaricales from Atlantic Forest fragments of Pernambuco, Northeast Brazil. *Mycotaxon* **118**: 137–146.

Anexo A – Protocolo de Coleta para Espécies do Gênero *Entoloma* - Michel Noordelos

HOW TO STUDY THE GENUS *ENTOLOMA* I

HOW TO COLLECT.

Good material facilitates identification. The following recommendations are made:

- Collect fresh specimens only, preferably both young and old fruitbodies. Be sure to collect the entire mushroom, inclusive of the stipe-base.
- Be careful not to mix up different species. Many *Entoloma* species, especially those from grassland, grow together on a quite small spot. -make a note of the habitat: type of vegetation, dominant trees, shrubs, herbs and mosses. Give a characterisation, if possible, of the soil-type. coloured photograph.
- Be aware of colour-changes during transport and storage. In many taxa the colour can change rapidly, not only because of the hygrophanous character of the pileus, but also subtle colours (especially blue, violaceous, pink etc.) may change or disappear. The best way is to make a note in the field, make a comparison with a colour-code, and make a coloured photograph.
- Note the smell and taste in the field and compare it with the smell and taste after transport in a small container. Temperature may be of big influence on these characters.
- Transport the fruitbodies of each collection separately in small boxes, carefully packed with some mosses or other soft material, so that they arrive home safely and undamaged. Do not collect small species in a basket.

AT HOME

If you want to name the species in a later stage, after that they have been dried, or if you want to save your material for deposit in your herbarium, make a full description of all macroscopic characters which disappear with drying. Make a habit sketch in pencil. This is very useful, even if you made a photograph. How nice your colour-slide may be, diagnostic characters often cannot be verified with certainty from it. Making a standard description for all your collections makes critical comparison easier and facilitates identification.

HOW TO MAKE A MACROSCOPICAL DESCRIPTION

There are several way of doing this, but it is important to do it always in the same way. Some people use pre-printed forms, other people write the description down for each collection. One of the advantages of a pre-printed form is that you not easily forget to note a character. When making description without a form, always use the same order. This also helps you not to forget things. For *Entoloma* the author uses the following order in his descriptions in this book:

Pileus [size in cm] [shape] [margin] [centre] [hygrophanicity] [translucency] [colour when moist] [colour when dry] [surface structure]. Lamellae [spacing, preferably L = 00-00 (number of entire lamellae), l = 00-00 (number of short lamellae), [insertion on stipe] [shape] [colour of sides] [shape and colour of edge] [other characteristics: veines on sides (transvenose) or veins between lamellae (intervenose)]. Stipe [dimensions in mm, length x width] [shape: cylindrical, compressed etc.] [shape of base: swollen, tapering etc.] [colour] [surface structure (glabrous, fibrillose-striate, squamulose etc.)] [basal tomentum] [context, colour, consistency] [smell] [taste] [spore print colour].

HOW TO STUDY THE GENUS *ENTOLOMA* 2

MICROSCOPICAL TECHNIQUES

I strongly recommend the following procedures, in order to be able to study the microscopy optimally:

Spores, hymenial structures like basidia, cystidia, and also clamp-connections:

Spores can be observed in water (fresh specimens) but since for basidia, clamps and cystidia you absolutely need. Colorant, I would skip observing in water and go straight away to Congo Red. This coloring agent is perfect for staining hyphal walls, and particularly in *Entoloma*, where walls often are very thin, you can much better look for clamps and cystidia in that way.

You need a solution of [1% Congo-red in concentrated ammonia]. This will keep for about a year, so regularly buy a fresh bottle.

- **Fresh material:** put a fragment of the lamella in Congo-red, let it stain a few minutes and observe.
- **Dried material:** put a fragment of the lamella in Congo-red, let it stain a few minutes. It may be necessary, particularly with old, or badly dried material, to warm it a bit with a small flame. Remove the excess Congo-red with a filter paper and replace it with a 5-10 % KOH solution. Observe in this medium.

In both cases be careful, and do not press the cover slip too much, leaving the fragment intact. Observe first with low magnification, to locate the structure you want to make visible. If you cannot see them properly, push gently on the cover slip until the hymenial elements lie free in the medium. The KOH makes this process easier. See also figure 1 below..

Pileipellis structure and pigmentation:

In order to get a good view of the pileipellis structure, I recommend to make a **radial** section. To get this, you need to cut a fruiting body in half, and then you can use the sharp razorblade point to carefully cut a section of the cap cuticle (pileipellis), preferably in the middle of the radius of the cap. Observe in water (fresh material), or better, in a saturated sugar or salt solution to make intracellular pigment more clearly visible.

For dried material (herbarium material) the procedure is slightly different: make a radial section of the pileipellis, and observe in 10 % ammonia. Do not use KOH, except in very old material that does not respond well to the ammonia treatment. KOH may change the tissues, so your measurements are not correct.