

Luciana Jandelli Gimenes

A tribo Leucocoprineae (Agaricaceae) no
Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São
Paulo, SP, Brasil

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

São Paulo
2007

Luciana Jandelli Gimenes

A tribo Leucocoprineae (Agaricaceae) no
Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São
Paulo, SP, Brasil

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

Orientadora: Dra Marina Capelari

“A persistência é o caminho do êxito.”
Charles Chaplin

Dedico,

Aos meus pais Ayrton e Denise e minha irmã Adriana, pelo amor, por sempre estarem presentes e pela certeza que em mim depositaram. Sem vocês absolutamente nada em minha vida teria sido possível.

Ao meu avô Pedro Lucio Jandelli que partiu alguns meses antes da conclusão de mais uma etapa de minha vida. Quantas saudades...

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A todos aqueles que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, em especial:

Ao Instituto de Botânica, em razão da cessão das instalações e pela infra-estrutura oferecida, principalmente à Seção de Micologia e Liquenologia pela utilização de laboratórios e equipamentos.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado disponibilizada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto (processo FAPESP 04/04319-2).

À Milena de Luna Alves Lima, grande amiga, que me acompanhou na realização deste trabalho, oferecendo, sempre, seu auxílio e apoio moral. Você foi meu “anjo da guarda científico”!

À Dra Marina Capelari pela orientação.

Aos pesquisadores e funcionários de apoio da Seção de Micologia e Liquenologia, pelas sugestões e amizade.

Aos funcionários da Biblioteca, em razão da presteza e bom atendimento que sempre me dispensaram.

Aos meus pais, Ayrton e Denise, meu eterno agradecimento, por toda força e confiança depositada.

À minha irmã Adriana, pelo incentivo, compreensão, torcida e apoio nas fases mais difíceis. Obrigada por ser a melhor irmã do mundo!

À Valdirene Moreira da Silva, pela ajuda em todos os momentos que precisei.

À minha avó Djanira Ribeiro Jandelli, pelo estímulo.

À grande amiga Renata Stella de Moraes Ferreira, por seu afeto e força em todos os momentos.

À minha querida amiga Diógina Barata, não só em razão do apoio e valiosas sugestões, mas principalmente por sempre me ouvir e estar ao meu lado nas ocasiões mais difíceis. Você mora no meu coração!

À minha amiga de todas as horas Luciana da Silva Canêz, pela grande amizade e ilimitado companheirismo.

Ao meu amigo Eduardo C. Gasparino, pelos momentos de descontração e alto astral. Não há como ficar triste ao seu lado!

À amiga Andrea Araújo, pelo afeto e conhecimento compartilhado neste período.

Ao meu amigo Adriano A. Spielmann pelas valiosas sugestões e possibilidade de desfrutar do seu vasto conhecimento.

À estimada amiga Adriana de Mello Gugliotta, pelas inúmeras sugestões, por dividir experiências, por sempre ser prestativa e pela amizade fraterna.

À minha “irmã científica” Carla Puccinelli, pelo companheirismo e carinho.

À Dra Rosely Ana Piccolo Grandi, pelas excelentes aulas na disciplina Diversidade de Fungos nos Ecossistemas.

Aos amigos da Seção de Micologia e Liquenologia do IBt: Alexandra L. Gomes, Carla Puccinelli, Carolina G. Moreira, Cristiane Nascimento, Fernanda Karstedt, Filipe R. Baptista, Glauciane D. Coelho, Maria Luiza de Miranda, Marina Bianchini, Nara Ballaminut, Priscila da Silva, Ricardo Soares, Ricardo R. da Silva, Sergio Moreira Neto, Stephanie Moreta, Tatiane Asai e William Okada, pelo convívio e inestimáveis momentos de descontração.

Ao pessoal do alojamento: Angélica Barbero, Angélica Righetti, Bárbara Guido, Bárbara M. Fonseca, Berta Villagra, Denílson Peralta, Fernanda Ferrari, Fernanda Ramlov, Giseli Nóbrega, Juçara Bordin, Kleber R. Santos, Luciane Crossetti, Milton Felix, Patrícia Junghblut, Rafael Louzada, Sabrina Latansio e Sandra Vieira, pelo prazeroso convívio e amizade.

Ao Dr. Ricardo Harakava do Instituto Biológico, pela realização dos seqüenciamentos de DNA e disposição em sempre ajudar.

À Patrícia Jungbluth, pela contribuição na formatação deste trabalho.

À Dra Leticia Ribes de Lima, pelas sugestões nas conclusões dos estudos moleculares.

Ao Dr. Maurício Bacci Junior, M.Sc. Giovana Gonçalves Vinha e Marcelo de Lima Marchesin, da UNESP de Rio Claro, em razão do precioso auxílio nas análises filogenéticas.

À ilustradora científica Maria Cecília Tomasi, pelo traçado à nanquim nas figuras.

Aos meus amigos micólogos gaúchos que tive o prazer de conhecer: Marcelo S. Rother (meu amigo virtual), Marcelo A. Sulzbacher e Vagner Gularte Cortez, cada um, por diferentes e significativas razões.

Ao Ulisses C. Peixoto, Bilú, pela disposição em ajudar nas nossas coletas e pelos vários materiais coletados.

À Márcia Regina Angelo, em decorrência de toda a atenção que sempre dispensou.

Enfim, a todos que, de diferentes formas e maneiras, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	1
1. A família Agaricaceae Fr.	1
2. A tribo Leucocoprineae Singer	3
3. Os gêneros <i>Chlorophyllum</i> , <i>Leucocoprinus</i> e <i>Macrolepiota</i>	6
4. Conhecimento da tribo Leucocoprineae	7
5. Objetivos	8
6. Literatura citada	8
CAPÍTULO II: MATERIAL E MÉTODOS	11
1. Caracterização da área	11
2. Coletas	11
3. Procedimento de coleta	11
4. Análise macroscópica	13
5. Obtenção de esporada e liofilização	13
6. Secagem do material	14
7. Acondicionamento do material	14
8. Análise microscópica	14
9. Extração de DNA	15
10. Reação de amplificação por PCR e purificação dos produtos	16
11. Seqüenciamento de DNA	18
12. Alinhamento das seqüências	19
13. Análise filogenética	20
14. Literatura citada	20

CAPÍTULO III: Artigo: <i>Leucocoprinus</i> (Agaricaceae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, SP	23
Introdução	25
Material e métodos	26
Resultados e discussão	30
Resultados moleculares	30
Resultados taxonômicos	34
Literatura citada	54
CAPÍTULO IV: Artigo: <i>Chlorophyllum</i> e <i>Macrolepiota</i> (Agaricaceae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, SP	58
Introdução	60
Material e métodos	61
Resultados e discussão	65
Resultados moleculares	65
Resultados taxonômicos	67
Literatura citada	79
CAPÍTULO V: CONSIDERAÇÕES FINAIS	83

APRESENTAÇÃO

Este trabalho representa o resultado do estudo taxonômico e molecular das espécies de fungos da tribo Leucocoprineae Singer coletados no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), o qual é tema da dissertação de mestrado da autora.

A dissertação é apresentada em capítulos, sendo que os capítulos I, II e V correspondem ao texto geral da dissertação e os demais são artigos que serão enviados para publicação.

O capítulo I constitui uma introdução sobre a família Agaricaceae, a tribo Leucocoprineae e os gêneros que pertencem à tribo.

No capítulo II é apresentado o material e métodos adotado para o desenvolvimento do trabalho.

O capítulo III corresponde ao artigo que será submetido para publicação na Revista Hoehnea, apresentando o resultado do estudo morfológico e molecular do gênero *Leucocoprinus*. O artigo está formatado nos moldes exigidos pela revista.

O capítulo IV refere-se ao artigo que será submetido para publicação na Revista Hoehnea, demonstrando o resultado do estudo taxonômico e molecular das espécies dos gêneros *Chlorophyllum* e *Macrolepiota*.

O capítulo V apresenta as considerações finais, sendo portanto, um fechamento da dissertação.

RESUMO

As espécies da tribo Leucocoprineae Singer do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) foram estudadas em aspectos morfológicos e moleculares. As coletas foram realizadas duas vezes por mês nos meses de setembro de 2004 a março de 2005, mensais nos meses restantes de 2005 e esporádicas nos meses de janeiro e fevereiro de 2006. Foram estudados os materiais já coletados e ainda não identificados e, também, revisados os depositados no Herbário SP. As análises taxonômicas e moleculares foram realizadas de acordo com os métodos usuais para o grupo de fungos estudados. Através deste estudo, verificou-se que a tribo Leucocoprineae no PEFI compreende as seguintes espécies: *Chlorophyllum molybdites* (Meyer: Fr.) Masee, *Chlorophyllum pulchellum* (de Meijer & Vellinga) Gimenes & Capelari, comb. nov., *Leucocoprinus birnbaumii* (Corda) Singer, *L. brebissonii* (Godey) Locq., *L. brunneoluteus* Capelari & Gimenes, *L. cepistipes* (Sowerby: Fr.) Pat., *L. cretaceus* (Bull.: Fr.) Locq., *L. fragillissimus* (Rav.) Pat., *Leucocoprinus* sp., *Macrolepiota* sp. e revisadas as exsicatas do Herbário SP, confirmando *Macrolepiota bonaerensis* (Speg.) Singer e *M. mastoidea* (Fr.) Singer. *Leucocoprinus cepistipes* sensu Candusso & Lanzoni, constitui primeira citação para o PEFI e para o estado de São Paulo. *Leucocoprinus* sp. e *Macrolepiota* sp. serão propostas como espécies novas e *C. pulchellum* como combinação nova. As análises moleculares foram realizadas usando o gene nLSU rDNA para a construção de árvores filogenéticas pelo método de parcimônia máxima. Sequências da região 25S e 28S da tribo disponíveis no GenBank foram usadas nas análises juntamente com as espécies do PEFI. Para cada espécie são apresentadas descrições, ilustrações, distribuição geográfica e uma chave de identificação para as espécies presentes no PEFI, sendo que todo o material estudado encontra-se depositado no Herbário SP.

ABSTRACT

The species of the tribe Leucocoprineae Singer from Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) were studied in taxonomy and molecular aspects. The fungi were collected two times each month September 2,004 to March 2,005, monthly on the remaining months of 2,005 and sporadically on months of January and February 2,006. Materials already collected and still not identified were also studied and the revised materials deposited in the SP Herbarium. The taxonomic and molecular analyses were realized according to with usual methods of the fungi groups studied. It was checked through this study that the tribe Leucocoprineae in PEFI includes the following species: *Chlorophyllum molybdites* (Meyer: Fr.) Masee, *Chlorophyllum pulchellum* (de Meijer & Vellinga) Gimenes & Capelari, comb. nov., *Leucocoprinus birnbaumii* (Corda) Singer, *L. brebissonii* (Godey) Locq., *L. brunneoluteus* Capelari & Gimenes, *L. cepistipes* (Sow.: Fr.) Pat., *L. cretaceus* (Bull.: Fr.) Locq., *L. fragillissimus* (Rav.) Pat., *Leucocoprinus* sp., *Macrolepiota* sp. and revised the exsiccata from SP Herbarium, confirming *Macrolepiota bonaerensis* (Speg.) Singer and *M. mastoidea* (Fr.) Singer. *Leucocoprinus cepistipes* sensu Candusso & Lanzoni is reported for the first time from PEFI and from the state of São Paulo. *Leucocoprinus* sp. and *Macrolepiota* sp. are proposed as new species and *C. pulchellum* as new combination. The molecular analyses were realized using the nLSU rDNA gene to construction filogenetic trees through maximum parsimony method. Sequences 25S and 28S region of tribe, available at GenBank, were used in the analyses with the PEFI species. For each one are presented descriptions, illustrations, geographic distribution and an identification key for species presents in the PEFI and the material studied is deposited in the SP Herbarium.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. A família Agaricaceae Fr.

A família Agaricaceae Fr., de acordo com Singer (1986), está classificada no Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Basidiomycetes, Ordem Agaricales. Agrupa os fungos que possuem como características macroscópicas principais píleo variando de convexo a aplanado, normalmente umbonado, liso a escamoso, lamelas sempre livres, estipe central e com anel presente. Microscopicamente caracteriza-se por apresentar basidiósporos ovóides ou elipsóides, dextrinóides, com poro de germinação presente ou ausente, basídios clavados, normalmente tetraesporados, pleurocistídios raros, queilocistídios normalmente presentes e trama da lamela regular a irregular.

Os fungos da família Agaricaceae são conhecidos popularmente como cogumelos, são na sua maioria saprófitas e participam da decomposição de folhas, galhos e troncos, sendo encontrados em uma grande variedade de substratos e em diferentes biomas, como mata, cerrado, floresta e restinga (Capelari 1989). Há representantes comestíveis, sendo o mais conhecido e cultivado no Brasil, *Agaricus bisporus* (Lange) Singer (champignon-de-paris) e algumas espécies de *Macrolepiota* que não se conhece cultivo em escala comercial. Algumas espécies são venenosas, como exemplo *Chlorophyllum molybdites* (Meyer: Fr.) Masee que, se consumido cru, pode causar problemas gastro-intestinais (Singer 1986).

A proposta de classificação de Singer (1986), no trabalho mais abrangente sobre a ordem Agaricales já publicado, aceita quatro tribos: Agariceae Pat., Cystodermateae Singer, Lepioteae Fayod e Leucocoprineae Singer, totalizando 25 gêneros, e dentro da tribo Leucocoprineae, Singer (1986) considera os gêneros *Chlorophyllum*, *Clarkeinda*, *Leucoagaricus*, *Leucocoprinus*, *Macrolepiota*, *Sericeomyces* e *Volvolepiota*. Singer (1975) não considerou o gênero *Sericeomyces*

pertencente à tribo, pois acreditava que este gênero era de fato uma transitoriedade entre as tribos Leucocoprineae e Lepioteae. Os dados moleculares suportam, em parte, a concepção morfológica da família Agaricaceae de acordo com Singer (1986) onde a tribo Cystodermateae, a qual já se encontrava numa posição de controvérsia entre Agaricaceae e Tricholomataceae (Thoen 1969, Heinemann & Thoen 1973), foi excluída da família por características morfológicas (Bas 1988) e mais tarde, a exclusão foi confirmada através de estudos moleculares com análises de parcimônia máxima (Johnson & Vilgalys 1998, Johnson 1999), passando-a para a família Tricholomataceae (Kirk *et al.* 2001, Moncalvo *et al.* 2002).

Johnson & Vilgalys (1998) testaram a classificação de Singer (1986) e concluíram que há uma confusão em relação à *Lepiota* s.l. com os gêneros segregados, sendo necessária uma reexaminação da monofilia de *Lepiota*. Alguns táxons secotioides (evolutivamente intermediários entre fungos agaricóides e gasteróides) têm afinidades com *Lepiota*. Em relação aos clados obtidos, há uma resolução limitada na ligação de *Lepiota* s.l., onde *Agaricus* e *Coprinus* seção *Comati* foram bem suportados como grupos monofiléticos dentro dos fungos lepiotóides, *Macrolepiota* foi moderadamente suportado, todos *Leucocoprinus* e algumas espécies de *Leucoagaricus* formam um clado com fungos cultivados por formigas e *Lepiota* s.str. está associada com um outro grupo de fungos cultivados por formigas, que são polifiléticos. As análises de nLSU rDNA indicaram um contraste com a classificação de Singer (1986), onde *Lepiota* s.l. é polifilética e estas análises não resolveram níveis genéricos dentro de *Lepiota* s.l. Os resultados de parcimônia são consistentes com a exclusão da tribo Cystodermateae da família Agaricaceae e a retenção das tribos Agariceae, Lepioteae e Leucocoprineae com a inclusão de *Coprinus comatus* e gêneros segregados incluindo *Montagnea* e *Podaxis*.

Em continuidade, Johnson (1999) fez uma análise filogenética usando caracteres chaves utilizados na taxonomia de *Lepiota* s.l., como também caracteres vegetativos e bioquímicos. As análises moleculares mostraram que a classificação de Singer (1986) das tribos Lepioteae e Leucocoprineae é sustentada por dados filogenéticos, *Leucoagaricus* é um gênero artificial e

necessita de mais estudo, *Chlorophyllum* não é claramente distinto de *Macrolepiota* pela morfologia, mas os dados moleculares suportam a retenção de *Chlorophyllum* como um gênero separado e *Lepiota* s.l. é um grupo artificial que compreende as tribos Lepioteae e Leucocoprineae, sendo monofilética somente quando inclui *Coprinus* seção *Comati* e/ou *Agaricus*. As análises mostraram também que a monofilia da tribo Lepioteae é suportada.

Moncalvo *et al.* (2000) representaram a primeira tentativa compreensiva para analisar relações filogenéticas dentro de Agaricales, incluindo 16 das 18 famílias reconhecidas por Singer (1986). Os resultados demonstraram que nLSU rDNA forneceram resoluções adequadas para identificar fungos agaricóides, com um bom suporte nos clados, tanto parcimônia quanto verossimilhança e suportam a classificação de Singer (1986), onde há a divisão de Agaricales em 3 subordens, Agaricineae, Boletineae e Russulineae. Árvores de verossimilhança e parcimônia realizadas em homobasidiomicetes baseadas nos genes 18S nuclear e 12S mitocondrial, suportam um grupo irmão entre boletóides e agaricóides. Análises combinadas de dados com o gene 18S RNA com nLSU rDNA ofereceram melhores resoluções no triângulo agaricóide-boletóide-russulóide.

O reconhecimento da ordem Agaricales como um clado monofilético foi sustentado por Moncalvo *et al.* (2002). De um modo geral, concluem não existir maiores conflitos entre resultados moleculares e a classificação de Singer (1986).

2. A tribo Leucocoprineae Singer

A tribo Leucocoprineae está classificada na família Agaricaceae e são cogumelos típicos, apresentando basidioma de tamanho médio a grande, estipe central, lamelas livres, esporada branca, creme, às vezes rosada ou verde, basidiósporos variando de médio a grande, ovóides a elipsóides, com poro de germinação presente, porém ausente em algumas espécies, dextrinóides e metacromáticos em azul de cresil. São na sua maioria saprófitos e sua importância, em termos

ecológicos, é o papel que desempenham na ciclagem de nutrientes. Recentemente, *Leucocoprinus birnbaumii* (Corda) Singer foi identificado como agente competidor em viveiros de produção de mudas de *Citrus* sp. e hortaliças (M. Capelari, comunicação pessoal).

Dos sete gêneros considerados pertencentes à tribo por Singer (1986), cinco deles são bem representados na microbiota brasileira (Pereira & Putzke 1990) com exceção de *Sericeomyces* Heinem. e *Clarkeinda* Kuntze. Para o PEFI também não há o registro destes dois gêneros. Três espécies de *Leucocoprinus* foram coletadas por Capelari (1989) no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP e Albuquerque (2006) identificou no Rio de Janeiro 14 espécies pertencentes à tribo Leucocoprineae, dos gêneros *Chlorophyllum*, *Leucoagaricus*, *Leucocoprinus* e *Macrolepiota*.

Conforme Singer (1986), a tribo está dividida nos gêneros *Chlorophyllum*, *Clarkeinda*, *Leucoagaricus*, *Leucocoprinus*, *Macrolepiota*, *Sericeomyces* e *Volvolepiota*. Tanto a classificação quanto a delimitação dos gêneros da tribo Leucocoprineae vêm sofrendo mudanças pela incorporação de análises moleculares.

De acordo com Moreno *et al.* (1995), há uma grande similaridade macro/microscópica de *Chlorophyllum* com *Macrolepiota* e segundo Singer (1986) estes dois gêneros diferem pela esporada verde, ansas presentes, basidiósporos metacromáticos em azul de cresil, propriedades venenosas e distribuição, principalmente, tropical e subtropical. Entretanto, estas características não definem e nem caracterizam *Chlorophyllum* como um gênero distinto. Por outro lado, similaridades macro/microscópicas entre *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* suportariam este sinônimo. Por estas razões transferem *Chlorophyllum molybdites* (Meyer: Fr.) Masee para *Macrolepiota* e propõem uma nova seção *Chlorophyllum* em *Macrolepiota* para acomodar a espécie. Tal proposta é inválida, pois o nome do gênero *Chlorophyllum* Masee 1898 precede *Macrolepiota* Singer 1948 por 50 anos.

Um reestudo das definições morfológicas de *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* foi proposto por Vellinga (2002) e também 13 novas combinações em *Chlorophyllum*. O gênero *Macrolepiota* Singer foi dividido em dois grupos. No s. str., *Macrolepiota* é dividido em duas seções,

Macrolepiota Singer e *Macrospora* (Singer) Bon com duas subseções, *Excoriatae* Bon e *Microsquamatae* (Pázmány) Bellù & Lanzoni defendida por em 1993 por Bon (Vellinga 2002). O segundo grupo compreende *Chlorophyllum* Masee, *Endoptychum agaricoides* Czern., *Leucoagaricus hortensis* Murrill e *Macrolepiota* seção *Laevistipes* (Pázmány) Bon (*M. rachodes* e espécies próximas).

Vellinga *et al.* (2003) concluíram que a família Agaricaceae mostrou ser monofilética baseada em estudos moleculares de ITS, LSU e SSU (Johnson & Vilgalys 1998, Johnson 1999, Moncalvo *et al.* 2000, 2002). O conceito tradicional de *Macrolepiota* como gênero agaricóide não pode ser mantido, baseado em análises combinadas de nLSU e ITS-LSU, ou seja, o conceito de *Macrolepiota* sofreu mudanças, onde há dois clados distintos dentro de *Macrolepiota*. Vellinga *et al.* (2003) propuseram duas classificações infragenéricas de *Macrolepiota*, a primeira é a divisão em duas seções baseadas na presença ou ausência de ansas (seção *Macrolepiota* com ansa e a seção *Macrospora* (Singer) Bon sem ansa) e a segunda é a classificação em três seções, *Macrolepiota* Singer, *Macrospora* (Singer) Bon e *Laevistipedes* (Pázmány) Bon.

Sete espécies de *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* para a Austrália foram listadas por Vellinga (2003), onde duas espécies eram novas, *C. nothorachodes* Vellinga & Lepp. e *M. eucharis* Vellinga & Halling. *C. hortense* (Murrill) Vellinga foi adotado como nome para *Leucoagaricus fimetarius* (Cooke & Masee) Aberdeen pela ausência de poro de germinação e presença de ansas. *C. brunneum* (Farl. & Burt.) Vellinga é o nome correto para as espécies frequentemente referidas na Austrália como *M. rachodes*.

Vellinga (2004) examinou a circunscrição da família Agaricaceae e as relações entre gêneros através de análises de seqüências de ITS e LSU, separadamente ou combinadas, resultou em exclusões e reorganizações. A tribo Agariceae é monofilética e o clado de *Agaricus* é um clado irmão de *Chlorophyllum*. A tribo Leucocoprineae é polifilética com *Macrolepiota* sensu Singer (1986) e está dividida em dois clados. Quanto à comparação com as classificações existentes de gêneros, onde há uma maior congruência entre a classificação morfológica e molecular nos clados,

a monofilia de *Leucoagaricus* é rejeitada e *Leucocoprinus* é aceitável, sendo que os dois gêneros combinados formam um grupo monofilético, mas sem suporte de “bootstrap”. Portanto, devido à baixa resolução da filogenia de seqüências de ITS e LSU (separadamente ou combinadas), a classificação baseada em caracteres morfológicos tem que ser mudada. Entretanto, muito embora tal conclusão possa ser prematura, é necessário o estudo detalhado de mais táxons gasteróides e de espécies tropicais.

3. Os gêneros *Chlorophyllum*, *Leucocoprinus* e *Macrolepiota*

Dentre os membros da tribo Leucocoprineae, o gênero *Leucocoprinus* macroscopicamente é caracterizado por possuir píleo aplanado, às vezes umbonado, com lamelas livres próximas entre si, com estipe central e cilíndrico e anel presente. Ao microscópio, as principais características são os basidiósporos de parede espessada, metacromáticos em azul de cresil, dextrinóides, com poro de germinação evidente, porém ausente em poucas espécies, ausência de pleurocistídios e queilocistídios sempre presentes. De acordo com Vellinga *et al.* (2001), há dois grupos distintos morfológicamente, um grupo com basidiósporos grandes, parede espessada e com poro de germinação e um outro grupo com basidiósporos pequenos, parede fina e sem poro de germinação.

Chlorophyllum e *Macrolepiota* são muito similares e macroscopicamente caracterizam-se por possuir píleo convexo a aplanado, lamelas livres e remotas do estipe, com base bulbosa no estipe, anel presente e bem evidente. Ao microscópio, apresentam basidiósporos grandes e com parede espessada, poro de germinação presente, dextrinóides, metacromáticos em azul de cresil, queilocistídios presentes e pleurocistídios ausentes. Porém, estas características não definem e nem separam os dois gêneros. Em princípio, *Chlorophyllum* era um gênero monoespecífico, com *C. molybdites* como única espécie, com esporada e basidiósporos verdes e Singer (1986) considerava estas características como as principais diferenças entre os dois gêneros. Posteriormente, com estudos moleculares, foi necessária uma delimitação da morfologia, já que

algumas espécies de *Chlorophyllum* não apresentam coloração esverdeada. Vellinga (2002) afirma que algumas características são fundamentais para distinguir estes dois gêneros, *Macrolepiota* no s.str. é caracterizado por apresentar superfície pilear tricodérmica, presença de uma cobertura visível no estipe com bandas coloridas e basidiósporos com o ápice arredondado com cobertura hialina sobre o poro de germinação e o gênero *Chlorophyllum* apresenta superfície pilear himenodérmica, estipe liso, basidiósporos com ou sem poro de germinação, sem capa hialina.

4. Conhecimento da tribo Leucocoprineae no PEFI

Os fungos da tribo Leucocoprineae são pouco conhecidos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, *Leucocoprinus cepistipes* Pat., *L. fragilissimus* (Rav.) Pat., *Chlorophyllum molybdites* (Meyer: Fr.) Masee como *Lepiota morganii* Peck., *Volvolepiota brunnea* (Rick) Singer como *Macrolepiota pulchella* foram listados por Bononi *et al.* (1981) e Grandi *et al.* (1984) listaram *Chlorophyllum molybdites* (Meyer: Fr.) Masee, *Leucoagaricus naucinus* (Fr.) Singer, *Leucocoprinus birnbaumii* (Corda) Singer, *Macrolepiota dolichaula* (Berk. & Br.) Pegler e *Macrolepiota mastoidea* (Fr.) Singer.

Posteriormente, Pegler (1997) acrescentou as espécies *Leucoagaricus hortensis* (Murrill) Pegler, *Leucoagaricus imperialis* (Speg.) Pegler, *Leucocoprinus brebissonii* (Godey) Locq., *Leucocoprinus meleagris* (Sowerby) Locq., *Leucocoprinus sulphurellus* Pegler, *Leucocoprinus venezuelanus* Dennis e *Macrolepiota bonaerensis* (Speg.) Singer, apresentando o material estudado na forma de uma chave de identificação. Não há publicações com descrições e ilustrações detalhadas, sendo a finalidade deste trabalho, mediante o estudo das exsicatas já depositadas no Herbário SP, materiais coletados e não identificados e também coletas recentemente realizadas.

Em 2004, *Leucocoprinus brunneoluteus* foi descrita para o PEFI por Capelari & Gimenes.

5. Objetivos

Efetuar o levantamento das espécies da tribo Leucocoprineae do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga e analisar o material do PEFI já depositado no Herbário SP, bem como o material coletado ainda não incorporado ao herbário, contribuindo então, para o aumento do conhecimento da biodiversidade paulista e brasileira;

Obter culturas puras deste grupo de fungos e material liofilizado para estudos moleculares;

Obter DNA livre de interferências ambientais complementando a taxonomia clássica.

6. Literatura citada

Albuquerque, M. P. 2006. Fungos Agaricales em trechos de Mata Atlântica da Reserva Biológica do Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Bas, C. 1988. Orders and families in agarics and boleti. *In*: C. Bas, T.W. Kuyper, M.E. Noordelous & E.C. Vellinga. Flora Agaricina Neerlandica. A. A. Balkema Publishers, Lisse, v. 1, pp. 40-49.

Bononi, V.L.R., Trufem, S.F.B. & Grandi, R.A.P. 1981. Fungos macroscópicos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil, depositados no Herbário do Instituto de Botânica. *Rickia* 9: 37-53.

Capelari, M. & Gimenes, L.J. 2004. *Leucocoprinus brunneoluteus*, uma nova espécie de Agaricaceae. *Hoehnea* 31: 331-335.

Capelari, M. 1989. Agaricales do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (exceto Tricholomataceae). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Grandi, R.A.P., Guzmán, G. & Bononi, V.L.R. 1984. Adições às Agaricales (Basidiomycetes do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. *Rickia* 11: 27-33.

- Heinemann, P. & Thoen, D.** 1973. Flore Illustrée des Champignons D' Afrique Centrale. Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique 2: 29-48.
- Kirk, P., Canon, P.F., David, J.C. & Stalpers, J.A.** 2001. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB International, Wallingford.
- Johnson, J.** 1999. Phylogenetic relationships within *Lepiota* sensu lato based on morphological and molecular data. Mycologia 91: 443-458.
- Johnson, J. & Vilgalys, R.** 1998. Phylogenetic systematics of *Lepiota* sensu lato based on nuclear large subunit rDNA evidence. Mycologia 90: 971-979.
- Moncalvo, J.-M., Lutzoni, F.M., Rehner, S.A., Johnson, J. & Vilgalys, R.** 2000. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. Systematic Biology 46: 278-305.
- Moncalvo, J.-M., Vilgalys, R., Redhead, S.A., Johnson, J.E., James, T.Y., Aime, M.C., Hofstetter, V., Verduin, S.J.W., Larsson, E., Baroni, T.J., Thorn, R.G., Jacobsson, S., Clémenco, H. & Miller Jr., O.K.** 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. Molecular Phylogenetics and Evolution 23: 357-400.
- Moreno, G., Bañares, A. & Heykoop, M.** 1995. *Macrolepiota molybdites* (Meyer: Fr.) comb. nov., new to the Canary Islands. Mycotaxon 55: 467-471.
- Pegler, D.N.** 1997. The Agarics of São Paulo, Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Pereira, A.B. & Putzke, J.** 1990. Famílias e gêneros de fungos Agaricales (cogumelos) no Rio Grande do Sul, R.S. Brasil Pesquisa 35: 1-37.
- Singer, R.** 1975. The Agaricales in modern taxonomy. 3rd ed. Vaduz: J, Cramer.
- Singer, R.** 1986. The Agaricales in modern taxonomy. 4th ed. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Thoen, D.** 1969. Le genre *Cystoderma* (Tricholomataceae) en Afrique Centrale. Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique 39: 183-190.
- Vellinga, E. C.** 2002. New combinations in *Chlorophyllum*. Mycotaxon 83: 415-417.

- Vellinga, E. C.** 2003. *Chlorophyllum* and *Macrolepiota* (Agaricaceae) in Australia. Australian Systematic Botany 16: 361-370.
- Vellinga, E.C.** 2004. Genera in the family Agaricaceae: evidence from nrITS and nrLSU sequences. Mycological Research 108: 354-377.
- Vellinga, E.C., Noordeloos, M.E. & Kuyper, TH. W.** 2001. Flora Agaricina Neerlandica: critical monographs on families of agarics and boleti occurring in the Netherlands. A. A. Balkema Publishers, Lisse, v.5, pp. 86-94.
- Vellinga, E. C., de Kok, R. P. J. & Bruns, T. D.** 2003. Phylogeny and taxonomy of *Macrolepiota* (Agaricaceae). Mycologia 95: 442-456.

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS

1. Caracterização da área

O Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) é uma reserva florestal urbana, situado na zona sul da cidade de São Paulo (23°39'S e 46°37'W), com altitude média de 798 m, ocupando uma área total de 549,31 ha, dos quais 162,69 ha estão sob responsabilidade do Instituto de Botânica. Informações a respeito da estrutura da vegetação, clima e solo podem ser encontradas em De Vuono (1985) e Bicudo *et al.* (2002). Devido a sua localização urbana (figura 1), o Parque é uma área de lazer muito utilizada pela população paulistana.

2. Coletas

Foram realizadas coletas duas vezes por mês, de setembro de 2004 a março de 2005 e esporádicas, nos meses restantes de 2005 e 2006 em função da temperatura e da umidade relativa. Também foram estudados materiais coletados ainda não identificados, assim como revisados os já depositados no Herbário SP.

3. Procedimento de coleta

Os materiais foram fotografados com câmera digital, coletados com o auxílio de uma faca ou canivete para facilitar a retirada do basidioma do substrato, colocados individualmente em sacos de papel e acondicionados de forma a manter bastante ar no seu interior, evitando, assim, danificar os fungos.

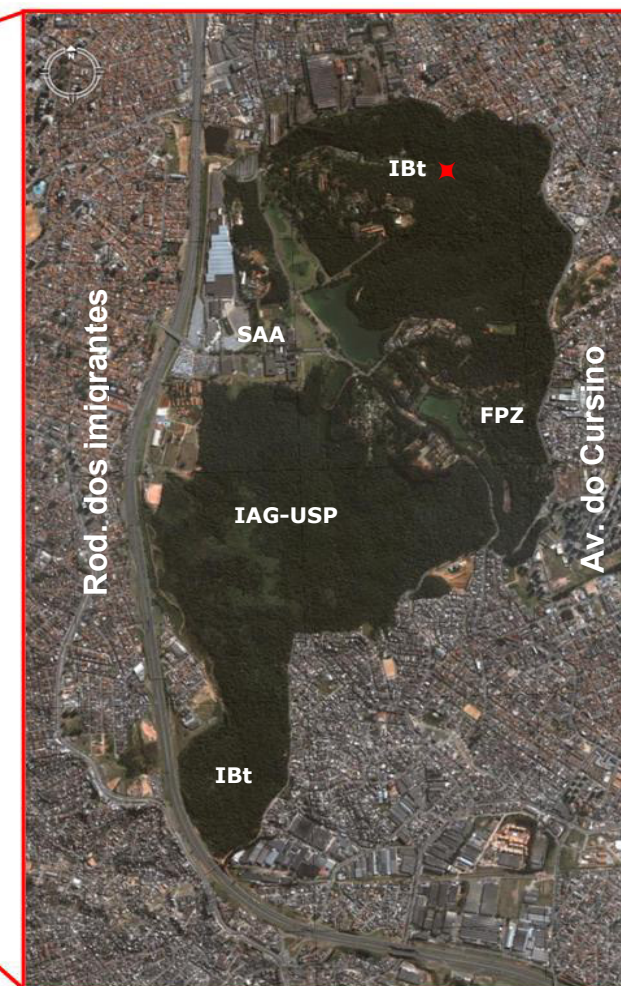


Figura 1: Localização do Parque Estadual Fontes do Ipiranga. IBt = Instituto de Botânica, SAA = Secretaria de Agricultura e Abastecimento, FPZ = Fundação Parque Zoológico, IAG-USP = Instituto de Astronomia e Ciências Atmosféricas da Cidade de São Paulo. ✦ - Área de Coleta.

4. Análise macroscópica

No laboratório foram anotados o maior número de caracteres macroscópicos, como basidioma, píleo, lamelas e estipe (Largent 1986), pois este grupo de fungos altera suas características depois de secos. Esta análise foi feita a olho nu e também com auxílio do microscópio estereoscópico. Após as anotações, foi fornecido um número de coletor para cada material.

5. Obtenção de esporada e liofilização

Após a anotação de todos os caracteres morfológicos, sempre que ocorreu a coleta de mais de um basidioma, foi obtida esporada, assim como fragmentos do material foram liofilizados para os estudos posteriores de análise molecular.

As culturas foram obtidas do basidioma ou da esporada. Quando se optou pela obtenção da cultura a partir do basidioma, foi retirado um pequeno fragmento do material, com o auxílio de um bisturi e de uma pinça, devidamente esterilizados, procedimento adotado para os fungos carnosos. Para fungos membranáceos, utilizou-se qualquer parte do basidioma, previamente limpo em solução de hipoclorito de sódio e água destilada para desinfecção e lavagem, respectivamente (Schulz *et al.* 1993). No entanto, em ambos os casos, três a quatro fragmentos foram dispostos em placas de petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), as quais foram incubadas a 27°C para que houvesse o crescimento micelial.

A esporada só foi realizada quando coletado mais de um basidioma, pois, após ficar 24 horas em câmara úmida, o fungo normalmente apodrece. A esporada foi realizada depositando-se o píleo com as lamelas para baixo num papel próprio (metade branco, metade preto). O píleo foi coberto com uma placa de petri, formando uma espécie de câmara úmida, por até 24 horas, onde os basidiósporos caíram no papel. Após este período, os papéis foram secos em sílica gel, dobrados,

inseridos num saco de polipropileno e guardados em geladeira. No momento que surgiu o interesse de fazer uma cultura pura a partir da esporada, um pequeno fragmento do papel foi cortado, colocado em água destilada autoclavada e 1 ml foi inoculado em meio de cultura BDA. Após o crescimento, a cultura foi utilizada e preparada pelo método de Castellani (Arora *et al.* 1991, Smith & Onions 1994) e incorporada à Coleção de Culturas de Basidiomicetos (CCB), sediada no Instituto de Botânica.

6. Secagem do material

Os materiais foram secos em estufas de 45-50 °C ou, quando os basidiomas eram menos carnosos, optou-se pela secagem em dessecador com sílica, sendo esta uma maneira de evitar que o DNA degrade quando os materiais são submetidos a altas temperaturas.

7. Acondicionamento do material

Após a secagem, os materiais foram acondicionados em sacos de polipropileno contendo naftalina, e colocados nos próprios sacos, onde estavam todas as anotações da coleta. Posteriormente, foram montadas exsiccatas de acordo com o padrão do Herbário do Instituto de Botânica (SP).

8. Análise microscópica

Depois da secagem, foi realizada a análise microscópica. Foram realizados cortes a mão livre, transversais ao píleo e lamela (Largent *et al.* 1986), com o auxílio de uma lâmina de barbear. O material foi reidratado em álcool 70% e montado entre lâmina e lamínula com KOH 4% (Martin 1934 *In* Fonseca 1999). Reagente de Melzer (Singer 1975) e azul de cresil (Largent *et al.* 1986)

foram utilizados para as reações de amiloidia e metacromatismo, respectivamente. Em relação à amiloidia, os basidiósporos podem ser inamilóides quando não há reação, amilóides quando a parede torna-se azulada e dextrinóides quando a parede do basidiósporo apresenta-se avermelhada. Quanto ao corante azul de cresil, a reação é metacromática quando a parede dos basidiósporos fica lilás e não metacromática quando não há reação. Estas reações também podem acontecer no contexto, com as mesmas denominações.

Todas as observações e medidas foram executadas em microscópio Olympus BX50 com aumento de 800 vezes. As estruturas microscópicas foram desenhadas com auxílio de câmara-clara acoplada ao microscópio. As medidas representaram os valores mínimos e máximos de cada estrutura e o índice Q foi obtido pela média do comprimento e da largura dos basidiósporos. Foram anotadas as características dos basidiósporos, basídios, cistídios, trama da lamela e superfície pilear.

9. Extração de DNA

A extração de DNA consiste na separação química das moléculas de DNA dos demais componentes celulares dos organismos e foi desenvolvida a partir de basidiomas frescos, herborizados, liofilizados ou de culturas e seguiu-se o protocolo para extração de DNA de Ferreira & Grattapaglia (1996). O DNA total foi extraído de aproximadamente 30-70 mg de material. As amostras foram trituradas nos próprios tubos com o auxílio de um pistilo, em presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Após a lise mecânica, o pó foi ressuspensão em 700 µl tampão de extração de CTAB acrescido de 2% de mercaptoetanol e misturado com auxílio de um vórtex para umedecer uniformemente o tecido. Os tubos com as amostras foram incubados em banho-maria a 60-65 °C por 30 minutos e homogeneizados a cada 10 minutos. Em seguida, extraiu-se com solvente orgânico adicionando 600 µl de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1), invertendo-os no mínimo 20 vezes ou até fazer uma emulsão homogênea e centrifugou-se a 12.000 - 15.000 rpm durante 5 minutos. Os tubos foram cuidadosamente retirados da centrífuga, evitando perturbar a

interface entre as duas fases formadas e a fase superior foi transferida para um novo tubo. Adicionou-se novamente 600 µl de CIA e adotaram-se os procedimentos seguintes até a mudança para um novo tubo. A solução foi precipitada adicionando 500 µl de isopropanol (-20 °C). Os tubos foram colocados no freezer (-20 °C) por 30 minutos, centrifugados a 7.000 rpm por 5 minutos e sobrenadante foi descartado. O DNA foi lavado com 1 ml de etanol 70% e deixado em repouso por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 7.000 rpm e descartados os sobrenadantes. Em seguida, foi adicionado 1 ml de etanol 70% e repetiu-se novamente o procedimento até o descarte do sobrenadante. Adicionou-se 1 ml de etanol absoluto, deixando o pellet imerso por 3 minutos. Após, foi descartado o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 50 µl de tampão TE. Para finalizar, acrescentou-se 2 µl de RNase e as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por, no mínimo, durante 1 hora para que houvesse a digestão do RNA.

A quantificação do DNA foi feita através de comparação de intensidade de fluorescência das bandas com concentrações crescentes e conhecidas de DNA do fago λ (12 ng, 24 ng, 50 ng, 100 ng, 150 ng e 200 ng). Para isso, as amostras foram diluídas (1:10), aplicadas em géis de agarose a 0,8% corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizadas no transiluminador em forma de bandas sob luz ultravioleta.

O DNA obtido foi armazenado em freezer a -20 °C para posteriormente ser utilizado nas reações de amplificação.

10. Reação de amplificação por PCR e purificação dos produtos

A técnica de amplificação de seqüências de DNA, também conhecida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é um processo em que uma região específica de interesse de DNA é copiada milhares de vezes, tornando-se mais abundante e permitindo sua posterior utilização (Oliveira 2001). As amostras que apresentaram quantidades suficientes de DNA foram submetidas à reação de PCR (tabela 2) em termociclador Techne, e utilizado os iniciadores LR0R, LR3R, LR7 e

LR16 (www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/) para a região nLSU. Os iniciadores se anelam com o DNA molde, previamente desnaturado, em uma região conhecida do gene. A duplicação ocorre através da extensão do iniciador por complementação e incorporação das quatro bases nitrogenadas (dNTPs), com auxílio da enzima *Taq DNA Polymerase*. Esta reação ocorre em cadeia, amplificando exponencialmente o gene que se deseja obter em grande quantidade (Milstein 2002).

Tabela 2. Concentrações dos reagentes utilizados na reação de amplificação do gene nLSU rDNA.

Reação	[]* inicial	[]* final	Vol. para 1 reação
H ₂ O	–	–	29,9 µl
TAMPÃO	10 ×	1 ×	5 µl
dNTP	2,5 mM	0,2 mM	4 µl
INICIADOR 1	10 µM	0,1 µM	0,5 µl
INICIADOR 2	10 µM	0,1 µM	0,5 µl
PVP	1 %	0,06 %	3 µl
MgCl ₂	10 mM	1,0 mM	5 µl
<i>TaqDNA Polymerase</i>	5 U/ µl	0,5 U/ µl	0,1 µl
DNA molde (1:10)	–	–	2 µl

[]*: Concentração

Na reação foi adicionado 4 µl de um “mix” dNTPs contendo as quatro bases nitrogenadas (dATP, dCTP, dGTP e dTTP). Foram feitas duas reações, a primeira contendo os iniciadores LR0R e LR16 e a segunda contendo os iniciadores LR3R e LR7. Como garantia ao número de amostras disponíveis, elaborou-se uma reação superveniente para suprir eventuais erros de pipetagem.

Os ciclos do termociclador nas reações de PCR consistiram em três etapas: (etapa 1) desnaturação inicial, 40⁰C, 2 min, 92⁰C, 5 min.; (etapa 2) desnaturação, 92⁰C, 40 s; anelamento, 40⁰C, 1,5 min.; extensão, 72⁰C, 2 min.; a etapa 2 é repetida 40 vezes; (etapa 3) extensão final, 72⁰C, 5 min.

Para visualização do produto das amplificações do gene nLSU rDNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em géis de agarose mais concentrados (1,4%), utilizando tampão TBE 1X, sob voltagem de 100 V por 50 minutos em média. O marcador DNA λ/Hind III foi utilizado

para estimar, por comparação a quantidade de pares de bases do DNA amplificado, confirmando a amplificação da região ribossomal de interesse. O gel foi corado em brometo de etídio (0,5 µg/ml) para visualização das bandas de DNA sob luz ultravioleta.

As amostras amplificadas foram purificadas utilizando o kit *Pure Link PCR Purification*TM (Invitrogen), a fim de remover impurezas como restos de nucleotídeos, sais, enzimas e iniciadores. Após a purificação, os produtos de PCR foram armazenados à -20 °C e submetidos ao seqüenciamento da região genômica de estudo.

11. Seqüenciamento de DNA

A etapa do seqüenciamento automático foi realizada em colaboração com o Dr. Ricardo Harakava do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico/SP. A região alvo utilizada para as análises filogenéticas foi parte do gene nuclear ribossomal da subunidade maior (nLSU) que engloba os domínios D1/ D2 como o descrito por Michot *et al.* (1984). A região D1/D2 na porção do gene nLSU mostrou conter os sítios filogenéticos mais informativos (Hopple and Vilgalys 1999, Moncalvo *et al.* 2000). As reações de seqüenciamento utilizaram os iniciadores: LR0R (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3'), LR16 (5'-TTCCACCCAAACTCG-3'), LR3R (5'-GTCTTGAAACACGGACC-3') e LR7(5'-TACTACCACCAAGATCT-3'). As seqüências foram geradas utilizando o seqüenciador automático modelo ABI 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.), utilizando 3 pmoles de cada iniciador e o kit *BigDye*TM *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems Co.) de acordo com as instruções do fabricante (tabela 3) . Os ciclos utilizados foram 96 °C a 10 s., 50 °C a 5 s. e 60 °C a 4 min.

Tabela 3. Reação de seqüenciamento segundo o modelo ABI 377.

REAÇÃO	Vol. para 1 reação
DNA	5,67 µl
Big Dye	2 µl
Save Money	2 µl
Iniciador	0,33 µl
Total	10 µl

As reações de seqüenciamento foram concentradas por precipitação com isopropanol a 75% (15 minutos à temperatura ambiente), lavadas em etanol a 70% e ressuspensas em 3 µL de tampão desnaturante (formamida + azul de dextran) e 1,5 µL foram aplicados em gel desnaturante do seqüenciador automático.

Repetições das reações de cada uma das amostras foram realizadas, com intuito de confirmar as seqüências obtidas. Nas amostras em que não se obteve uma boa seqüência, ou seja, quando houveram ambigüidades em determinados sítios da seqüência, foi feita uma análise visual detalhada. Os eletroferogramas foram analisados em detalhe para confirmar o nucleotídeo exato de determinada posição. Quando tal determinação não foi possível, a região duvidosa foi seqüenciada novamente para a obtenção de uma seqüência de consenso de todas as repetições das amostras.

12. Alinhamento das seqüências

As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências já disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando o programa BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*. O BLAST é um programa que busca a similaridade entre as seqüências geradas com as seqüências identificadas e armazenadas no GenBank.

Os eletroferogramas das seqüências geradas pelo seqüenciador automático foram copiladas e editadas utilizando o programa BioEdit - *Biological Sequence Alignment Editor*

(www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html). O início e o final foram eliminados, quando não havia uma boa definição de cada uma das bases e os “gaps” também foram retirados. Com o programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994) foram alinhadas as seqüências das amostras do PEFI com as seqüências selecionadas no GenBank da tribo Leucocoprineae referentes às regiões 25S e 28S já publicadas (Johnson & Vilgalys 1998, Johnson 1999, Vellinga 2004). Algumas seqüências foram acertadas manualmente, possibilitando assim a visualização das regiões mais conservadas e com maiores variações.

13. Análise filogenética

Análise de parcimônia máxima foi escolhida como critério de otimização e busca heurística utilizando-se o algoritmo de “branch-swapping: tree bisection-reconnection” (TBR) com árvores iniciais obtidas pelo algoritmo de “stepwise adition”, usando o programa PAUP* versão 4.0b10 (Swofford 2002) para todas as análises. Todos os caracteres foram considerados como não ordenados, com pesos iguais para as mudanças. *Lepiota cristata* (Bolt.: Fr.) Kumm. foi escolhida como grupo externo. Análises de “bootstrap” (Felsenstein 1985) com 1000 replicações foram implementadas para verificação da robustez dos ramos em cada conjunto de dados.

As análises foram realizadas em duas fases: primeiro, somente o gênero *Leucocoprinus* e posteriormente *Chlorophyllum* com *Macrolepiota*, já que fazem parte do mesmo clado.

14. Literatura citada

Arora, S.K., Elander, R.P. & Mukerji, K.G. 1991. Handbook of applied mycology - Fungal Biotechnology, v.4, New York.

- Bicudo, D.C., Forti, M.C. & Bicudo, C.E.M.** 2002. Parque Estadual das Fontes do Ipiranga: unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, São Paulo.
- De Vuono, Y. S.** 1985. Fitossociologia do estrato arbóreo da floresta da Reserva Biológica do Instituto de Botânica (São Paulo, SP). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D.** 1996. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: Embrapa – Cenargen.
- Fonseca, M.P.** 1999. Aphyllophorales lignocelulíticos da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Hopple, J.S & Vilgalys, R.** 1999. Phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: divergent domains, outgroups and monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 1-19.
- Johnson, J.** 1999. Phylogenetic relationships within *Lepiota* sensu lato based on morphological and molecular data. *Mycologia* 91: 443-458.
- Johnson, J. & Vilgalys, R.** 1998. Phylogenetic systematics of *Lepiota* sensu lato based on nuclear large subunit rDNA evidence. *Mycologia* 90: 971-979.
- Largent, D.L.** 1986. How to identify mushrooms to genus. I. macroscopic features. Mad River Press, Eureka.
- Largent, D.L., Johnson, D. & Watling, R.** 1986. How to identify mushrooms to genus. III. microscopic features. Mad River Press, Eureka.

- Michot, B., Hassouna, N. & Bachellerie, J.P.** 1984. Secondary structure of mouse 28S rRNA and general model for the folding of the large rRNA in eukaryotes. *Nucleic acids Research* 12: 4259-4279.
- Milstein, D.** 2002. Filogenia molecular de espécies de *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) do Atlântico Sul. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Moncalvo, J.-M., Lutzoni, F.M., Rehner, S.A., Johnson, J. & Vilgalys, R.** 2000. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* 46: 278-305.
- Oliveira, M.C.** 2001. Estudios da la macro y microbiodiversidad de las algas. Secuenciamento del DNA ribosomal (rDNA). *In*: K. Alveal & T. Antezana (eds.), *Sustentabilidad de la biodiversidad, un problema actual. Bases Científico-Técnicas, teorizaciones y proyecciones.* Universidad de Concepción, Concepción, pp. 85-96.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., 3 vol. Cold Spring Harbour Laboratories Press, New York.
- Schulz, B., Wanke, U., Draeger, S. & Aust, H.-J.** 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research* 97: 1447-1450.
- Singer, R.** 1975. *The Agaricales in Modern Taxonomy*. 3rd ed. Vaduz: J, Cramer.
- Smith, D. & Onions, A.H.S.** 1994. *The Preservation and Maintenance of Living fungi -* Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Swofford, D.L.** 2002. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Vellinga, E.C.** 2004. Genera in the family Agaricaceae: evidence from nrITS and nrLSU sequences. *Mycological Research* 108: 354-377.

CAPÍTULO III

***Leucocoprinus* (Agaricaceae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga,**

São Paulo, SP, Brasil

Luciana Jandelli Gimenes¹, Milena de Luna Alves Lima², Ricardo Harakava³ e Marina Capelari²

1. Instituto de Botânica, Seção de Micologia e Liquenologia, Caixa Postal 3005, 01061-970, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: lujandelli@iron.com.br (autora para correspondência).
2. Pesquisadora Científica, Instituto de Botânica, Seção de Micologia e Liquenologia.
3. Pesquisador Científico, Instituto Biológico, Laboratório de Bioquímica Fitopatológica.

ABSTRACT – (*Leucocoprinus* (Agaricaceae) from Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brazil). This study describes the species of *Leucocoprinus* from Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) with descriptions, illustrations, an identification key and relevant comments as well as the filogenetic relationships between the species of genera found, using the nLSU rDNA region. *L. cepistipes* is cited for the first time from PEFI and from the state of São Paulo. The other species found were *L. birnbaumii*, *L. brebissonii*, *L. brunneoluteus*, *L. cepistipes*, *L. fragilissimus* and *Leucocoprinus* sp.

Key words: Phylogeny, tribe Leucocoprineae, nLSU rDNA, taxonomy

RESUMO – (*Leucocoprinus* (Agaricaceae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil). Este trabalho reporta as espécies do gênero *Leucocoprinus* que ocorrem no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), apresentando descrições, ilustrações, chave de identificação e comentários pertinentes bem como as relações filogenéticas entre as espécies encontradas do gênero, usando a região nLSU rDNA. *L. cepistipes* constitui primeira citação para o PEFI e para o estado de São Paulo; as demais espécies encontradas foram *L. birnbaumii*, *L. brebissonii*, *L. brunneoluteus*, *L. cretaceus*, *L. fragilissimus* e *Leucocoprinus* sp.

Palavras-chave: Filogenia, tribo Leucocoprineae, nLSU rDNA, taxonomia

Introdução

O gênero *Leucocoprinus* Pat. está inserido na Família Agaricaceae (Singer 1986) e macroscopicamente é caracterizado por possuir píleo aplanado, às vezes umbonado, estriado-plicado na superfície inteira (exceto umbo), ou pelo menos na margem, com lamelas livres próximas entre si e com estipe central e cilíndrico com anel, que pode ser persistente ou evanescente, dependendo da espécie. Ao microscópio, as principais características são os basidiósporos de parede espessada, metacromáticos em azul de cresil, dextrinóides, com poro de germinação evidente, porém ausente em poucas espécies, ausência de pleurocistídios e queilocistídios sempre presentes. De acordo com Vellinga (2001), há dois grupos distintos morfologicamente, um grupo com esporos grandes, parede espessada e com poro de germinação e um outro grupo com esporos pequenos, parede fina e sem poro de germinação. Apresentam hábito solitário a gregário, às vezes cespitosos, terrestres e ocorrem principalmente em regiões tropicais.

A delimitação do gênero utilizada neste trabalho segue Singer (1986) que considera *Leucocoprinus* na família Agaricaceae, tribo Leucocoprineae, junto com os gêneros *Clarkeinda*, *Chlorophyllum*, *Volvolepiota*, *Macrolepiota*, *Leucoagaricus* e *Sericeomyces*. A delimitação de tribos e gêneros da família Agaricaceae como proposta por Singer (1986) vem sendo questionada através de estudos tanto morfológicos como moleculares (Johnson & Vilgalys 1998, Moncalvo *et al.* 2002, Vellinga 2004) e, até o momento, *Leucocoprinus* e *Leucoagaricus* juntos formam um clado monofilético que também inclui o gênero polifilético *Sericeomyces*, gênero desconhecido no Parque Estadual das Fontes Ipiranga (PEFI) e atualmente considerado como sinônimo de *Leucoagaricus* (Vellinga 2001).

O gênero compreende cerca de 40 espécies com distribuição mundial, sendo a maioria de distribuição tropical (Kirk *et al.* 2001). Os fungos do gênero *Leucocoprinus* no PEFI, foram listados por Bononi *et al.* (1981) e Grandi *et al.* (1984). Posteriormente, Pegler (1997) acrescentou quatro espécies, apresentando-as na forma de uma chave de identificação e não há para o PEFI publicações

com descrições e ilustrações detalhadas. Para o parque há, em literatura, o registro de sete espécies, *L. birbaumii* (Corda) Singer (Grandi *et al.* 1984, Pegler 1997), *L. brebissonii* (Godey) Locq. (Pegler 1997), *L. cepistipes* (Sowerby: Fr.) Pat. (Bononi *et al.* 1981), *L. fragilissimus* (Rav.) Pat. (Bononi *et al.* 1981, Pegler 1997), *L. meleagris* (Sowerby) Locq., *L. sulphurellus* Pegler e *L. venezuelanus* Dennis (Pegler 1997).

O presente trabalho tem como objetivo fazer um levantamento dos fungos do gênero *Leucocoprinus* no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, com base em estudos taxonômicos e moleculares.

Material e Métodos

O Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) é uma reserva florestal urbana, situado na zona sul da cidade de São Paulo (23°39'S e 46°37'W), com altitude média de 798 m, ocupando uma área total de 549,31 ha, dos quais 162,69 ha estão sob responsabilidade do Instituto de Botânica. Informações a respeito da estrutura da vegetação, clima e solo podem ser encontradas em De Vuono (1985) e Bicudo *et al.* (2002).

Coletas no parque foram realizadas duas vezes por mês nos meses, de setembro de 2004 a março de 2005 e esporádicas nos meses restantes de 2005 e 2006 em função da temperatura e da umidade relativa. Foram revisados os materiais já depositados no Herbário SP e analisados também os já coletados e ainda não identificados.

Na coleta, os materiais foram fotografados e colocados individualmente em sacos de papel. No laboratório foram descritos macroscopicamente e, então secos em estufa entre 45-50 °C. Sempre que possível, foi obtida esporada e fragmentos do material foram liofilizados para os estudos de análise molecular.

Para a análise microscópica, foram feitos cortes a mão livre, transversais ao píleo e lamela (Largent *et al.* 1986). O material foi reidratado em álcool 70% e montado entre lâmina e lamínula

com KOH 4% (Martín 1934 *In* Fonseca 1999). Reagente de Melzer (Singer 1975) e azul de cresil (Largent *et al.* 1986) foram utilizados para as reações de amiloidia e metacromatismo, respectivamente. As observações e medidas foram realizadas em microscópio Olympus BX50 com aumento de 800 vezes. As estruturas microscópicas foram desenhadas com auxílio da câmara-clara acoplada ao microscópio. As medidas representam os valores mínimos e máximos de cada estrutura e o índice Q foi obtido pela média do comprimento e da largura dos basidiósporos.

Para cada espécie são apresentados descrições, ilustrações, distribuição geográfica e comentários pertinentes, além de uma chave de identificação para as espécies presentes no parque.

Para a análise molecular, a extração foi realizada a partir de basidiomas frescos, herborizados, liofilizados ou de culturas e seguiu-se o protocolo para extração de DNA, segundo Ferreira & Grattapaglia (1996).

Os materiais utilizados foram submetidos à reação de polimerização em cadeia (PCR) e utilizados os iniciadores específicos, LR0R, LR3R, LR7 e LR16 (www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/) para amplificação do gene nLSU rDNA. Os ciclos do termociclador nas reações de PCR consistiram em três etapas: (etapa 1) desnaturação inicial a 40°C, 2 min, 92°C, 5 min.; (etapa 2) 92°C, 40 s, 40°C, 1,5 min., 72°C, 2 min. A etapa 2 é repetida 40 vezes; (etapa 3) extensão final, 72°C, 5 min. O produto de amplificação gerado foi purificado utilizando o *Pure Link PCR Purification*TM (Invitrogen). O seqüenciamento foi realizado com o seqüenciador automático modelo ABI 377 com o kit *BigDye*TM *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems Co.) e os mesmos iniciadores usados para a reação de PCR, de acordo com as instruções do fabricante. Foram efetuadas várias repetições de reações de cada uma das amostras, com intuito de conseguir seqüências bem definidas para facilitar o posterior alinhamento. Nas amostras em que não se obteve uma boa seqüência, foi efetivada uma seqüência de consenso de todas as repetições das amostras.

As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências já disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Após, as seqüências foram editadas com o programa BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html) e retirados os “gaps”. O alinhamento foi realizado com o programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994) de todas as seqüências obtidas com as seqüências selecionadas no GenBank do gênero *Leucocoprinus* (tabela 1) referentes às regiões 25S e 28S e também seqüências já publicadas (Johnson & Vilgalys 1998, Johnson 1999, Vellinga 2004).

Análise de parcimônia máxima foi escolhida como critério de otimização e busca heurística, usando o programa PAUP* versão 4.0b10 (Swofford 2002). Todos os caracteres foram considerados como não ordenados, com pesos iguais para as mudanças. *Lepiota cristata* (Bolt.: Fr.) Kumm. foi escolhida como grupo externo. Análises de “bootstrap” (Felsenstein 1985) com 1000 repetições foram implementadas para verificação da robustez dos ramos em cada conjunto de dados.

Tabela 1. Espécies e coleções de *Leucocoprinus* do PEFI e número de acesso das espécies importadas do GenBank das seqüências de nLSU rDNA. Grupo externo: *Lepiota cristata*.

Espécie	Coleção ou Herbário	Local de Origem	Nº de acesso no GenBank	Referência
<i>Lepiota cristata</i>	–	E.U.A.	U85292	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>L. birnbaumii</i>	LJG0115/05	Brasil	–	Este trabalho
<i>L. birnbaumii</i>	*CCB658	Brasil	–	Este trabalho
<i>L. birnbaumii</i>	–	Inglaterra	U85288	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>L. birnbaumii</i>	–	E.U.A.	AF041541	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>L. brebissonii</i>	LJG0116/05	Brasil	–	Este trabalho
<i>L. brebissonii</i>	–	França	AY176446	Vellinga (2004)
<i>L. cf. brebissonii</i>	–	Costa Rica	U85290	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>L. brunneoluteus</i>	MC4144	Brasil	–	Este trabalho
<i>L. cepistipes</i>	–	Inglaterra	U85305	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>L. cepistipes</i>	–	Colômbia	U85306	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>L. cepistipes</i>	–	Inglaterra	U85286	Johnson (1999)
<i>L. cepistipes</i>	LJG083/05	Brasil	–	Este trabalho
<i>L. cretaceus</i>	SP307934	Brasil	–	Este trabalho
<i>L. cretaceus</i>	–	Holanda	AY176448	Vellinga (2004)
<i>L. cretaceus</i>	–	Holanda	AF482892	Vellinga <i>et al.</i> (2003)
<i>L. fragilissimus</i>	LJG097/05	Brasil	–	Este trabalho
<i>L. fragilissimus</i>	–	Costa Rica	U85289	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>L. fragilissimus</i>	–	E.U.A.	AF04150	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>Leucocoprinus</i> sp	SP307941	Brasil	–	Este trabalho

*CCB: Coleção de Culturas de Basidiomicetos

Resultados e Discussão

Foram encontradas no PEFI: *Leucocoprinus brunneoluteus* Capelari & Gimenes, *L. cretaceus* (Bull.: Fr.) e *Leucocoprinus* sp. e já haviam sido citadas para o parque *L. birnbaumii* (Corda) Singer, *L. brebissonii* (Godey) Locq., *L. cepistipes* (Sowerby: Fr.) e *L. fragilissimus* (Rav.) Pat. Os materiais citados por Bononi *et al.* (1981) como *L. cepistipes* são na verdade *L. cretaceus*.

As exsicatas de *Leucocoprinus meleagris* (Sowerby) Locq. e *L. sulphurellus* Pegler mencionadas por Pegler (1997) não foram localizadas no Herbário SP e como não ocorreram novas coletas destes materiais, não estão sendo consideradas neste trabalho. Também, *L. sulphurellus* foi, recentemente, transferido para o gênero *Leucoagaricus* (Akers *et al.* 2000).

Pegler (1977) cita ainda três exsicatas (SP194146, SP214419, SP214319) de *L. venezuelanus* para o PEFI e apenas o exemplar SP194146 foi localizado no Herbário SP e após análise, constatou-se ser um exemplar de *L. brebissonii* e não *L. venezuelanus*.

Resultados moleculares

O tamanho do gene nLSU das espécies estudadas de *Leucocoprinus*, variou de 670 a 700 pares de bases (pb) e as seqüências do GenBank variaram de 1050 a 1100 pb. Após remover os extremos das seqüências, 396 caracteres foram excluídos, permanecendo 578 caracteres dos quais 495 são constantes e 51 caracteres variáveis não informativos. Todos os caracteres foram considerados como não ordenados, com pesos iguais para as mudanças. Resultados usando simples adição de seqüências, os algoritmos de “branch-swapping: tree bisection-reconnection” (TBR) e MAXTREES, produziram uma árvore mais parcimoniosa (figura 1), com 99 passos, índice de consistência (CI) = 0,7236 e índice de retenção (RI) = 0,5952.

As árvores geradas por parcimônia máxima não tiveram muita variação nos clados, concluindo-se que o gene nLSU não foi um marcador eficiente para o gênero *Leucocoprinus*. As

seqüências eram muito próximas, portanto uma região muito conservada e pouco informativa, ocasionando várias politomias.

Leucocoprinus cf. *brebissonii* (U85290) agrupou com *Leucocoprinus brebissonii* (PEFI) com um suporte de 57% de “bootstrap”. Johnson & Vilgalys (1998) consideraram U85290 como *L. cf. brebissonii*, sendo um *L. brebissonii* ou uma espécie muito próxima.

Em relação a *L. cretaceus*, houve um agrupamento com suporte de 100% entre os três espécimes citados, confirmando então, a identificação morfológica do material do PEFI como *L. cretaceus*.

Quanto a *L. cepistipes*, houve um agrupamento em dois ramos diferentes, onde *L. cepistipes* (PEFI) agrupou com *L. cepistipes* (U85306) com um suporte de 80% e no outro ramo agruparam *L. cepistipes* (U85305) e *L. cepistipes* (U85286). Provavelmente a divisão em dois ramos tenha sido ocasionada pelo gene nLSU não ser eficiente para o gênero ou pela distribuição geográfica dos espécimes.

Os espécimes de *L. fragilissimus* estudados agruparam com um suporte de 52% entre *L. fragilissimus* (PEFI) e os dois espécimes do GenBank (U85289 e AF041540), sendo que estes últimos tiveram um suporte de 100%. Portanto, conclui-se que o gene nLSU foi informativo, sendo uma confirmação que o material do PEFI é um *L. fragilissimus*.

A respeito da politomia que está apresentada na árvore, não é possível afirmar com total certeza, mas algumas suposições podem ser feitas: *L. birnbaumii* (LJG0115/05) e *L. birnbaumii* (CCB 658) são materiais muito próximos morfológicamente, com uma pequena variação quanto às escamas, castanhas em *L. birnbaumii* e amarelas em *L. birnbaumii* (CCB 658). Os espécimes de *L. birnbaumii* importados do GenBank são de clima temperado (Inglaterra e E.U.A.) e os estudados neste trabalho são de clima tropical. Uma outra questão a se estudar mais profundamente, é a possibilidade destes materiais de clima temperado não serem o mesmo espécime de *L. birnbaumii* daqui do Brasil. Portanto, é necessário fazer uma análise morfológica mais rigorosa, principalmente microscópica, para certificar se realmente não se tratam de duas espécies distintas. Como sugestão

para resolver o problema da politomia, será a realização de análises filogenéticas com outros genes ou baseadas em caracteres morfológicos.

Leucocoprinus sp. é uma das poucas espécies do gênero sem poro de germinação o que pode possibilitar uma confusão com *Lepiota*. Como o gene nLSU não foi informativo para elucidar o posicionamento taxonômico da espécie e também para ter certeza de que *Leucocoprinus* sp. não era de fato uma espécie de *Lepiota*, algumas seqüências do gene nLSU deste último gênero depositadas no GenBank e seqüências de *Leucocoprinus* foram analisadas por parcimônia máxima (dados não mostrados) e *Leucocoprinus* sp., segregou com as demais espécies de *Leucocoprinus* e não com *Lepiota*.

L. brunneoluteus é uma outra espécie que também não se pode afirmar com total certeza, devido ao fato de ter como resultado uma politomia. Conclui-se portanto, que o gene nLSU não foi um marcador eficiente para a espécie e para tentar resolver este problema, será necessário análises com outros genes.

Apesar do gene nLSU não ter sido um marcador eficiente para o gênero *Leucocoprinus*, foi possível confirmar a identificação morfológica de *L. cretaceus* e *L. cepistipes*. Após as análises moleculares, *Leucocoprinus* sp. foi confirmada como uma espécies do gênero *Leucocoprinus* e não de *Lepiota*.

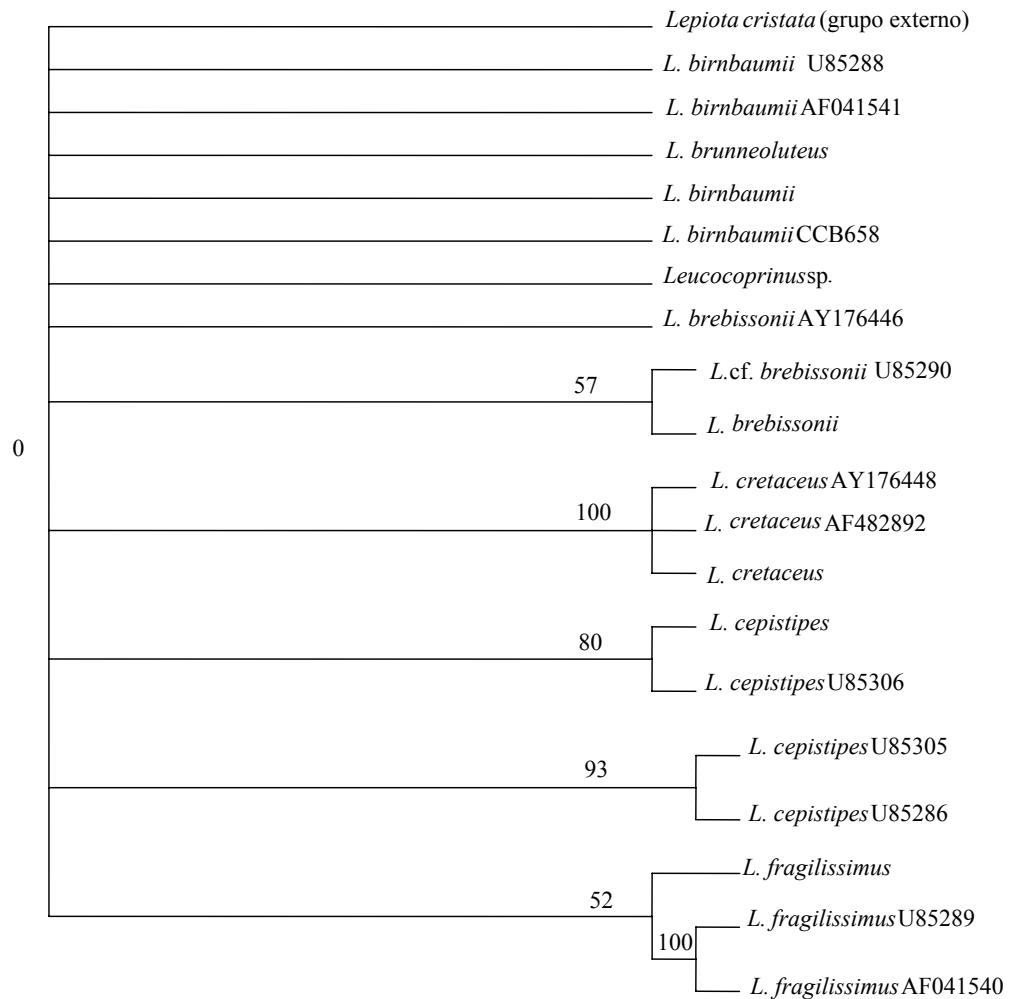


Figura 1. Árvore filogenética de máxima parcimônia. Os valores de “bootstrap” para o método de MP (1000 replicações) são em porcentagens e estão marcados nos ramos. Foi obtida 01 árvore mais parcimoniosa, com índice de consistência (CI) = 0,7236 e índice de retenção (RI) = 0,5952.

Resultados taxonômicos

Chave de identificação

1. Píleo branco 2
1. Píleo amarelo 3
2. Píleo branco com escamas marrons 4
2. Píleo branco com escamas brancas ou amarelas 5
3. Píleo amarelo-gema, com centro e escamas marrons 3. *L. brunneoluteus*
3. Píleo amarelo-canário, escamas amareladas a amarronzadas 6
4. Escamas marrons, centro liso marrom, basidiósporos elipsóides, $10,0-12,5 \times 6,25-8,75 \mu\text{m}$
..... 2. *L. brebissonii*
4. Escamas marrom-acinzentadas, basidiósporos ovóides a elipsóides, $10,0-11,5 \times 6,5-7,5 \mu\text{m}$
..... 4. *L. cepistipes*
5. Basidioma robusto, escamas brancas, píleo completamente escamoso-flocoso, estipe branco-puro,
depois levemente amarelado, basidiósporos elipsóides, $8,75-10 \times 5,0-6,25 \mu\text{m}$
..... 5. *L. cretaceus*
5. Basidioma frágil, escamas amarelas recobrimdo o plicado do píleo, estipe branco com escamas
amarelas, basidiósporos elípticos, $10,0-12,5 \times 7,5-10,0 \mu\text{m}$ 6. *L. fragilissimus*
6. Centro e escamas amarelas a amarronzadas, basidiósporos ovóides a elipsóides, $10,0-11,25 \times$
 $6,25-7,5 \mu\text{m}$, com poro de germinação 1. *L. birnbaumii*
6. Centro amarelo mais escuro, basidiósporos elipsóides, $6,5-7,5 \times 4-6,5 \mu\text{m}$, sem poro de
germinação 7. *Leucocoprinus* sp.

1. *Leucocoprinus birnbaumii* (Corda) Singer, Sydowia 15: 67. 1962.

Basiônimo: *Agaricus birnbaumii* Corda, Icon. Fung. 3: 48. 1839.

A. cepaestipes Sow. ex. Fr. var. *lutea* Bolt. Ex Secr., Mycogr. Suisse 1: 56. 1833.

A. flos-sulphuris Schnizlein in Sturm, Deut. Fl. 3 (31). 1851.

A. cepaestipes Sow. ex. Fr. var. *flos-sulphuris* (Schnizlein) Oudemans in Arch. Neerland. Sci exact. Nat. 2: 19. 1867.

Lepiota flammula (Alb. & Schw.) Gillet, Champ. Fr.: 63. 1874.

L. lutea (Bolt. ex Secr.) Godfrin in Bull. Soc. Mycol. Fr. 13: 33. 1897.

L. aurea Masee in Bull. Misc. Inf. Kew 1912: 189. 1912.

L. pseudolcymophora Rea, Brit. Basid.: 74. 1922.

L. coprinoides Beeli in Fl. Icon. Champ. Congo 2: 42. 1936.

Leucocoprinus luteus (Bolt. Ex Secr.) Locq. In Bull. Soc. Linn. Lyon 14: 93. 1945.

L. flos-sulphuris (Schnizlein) Cejp in Česká Mykol. 2: 78. 1948.

Sinônimos de acordo com Pegler 1983.

Figuras 2 a-c, 9

Pileo cônico quando jovem a aplanado quando maturo, amarelo-canário, retendo um pequeno umbo amarelo ou marrom-claro, escamoso, escamas amarelas concolores com pileo ou marrom-claras, com distribuição mais ou menos concêntrica em direção à margem, até 2/3 do diâmetro, depois estriado até a margem, seco, não higrófono, até 10 cm diâm. Lamelas livres, porém muito próximas do estipe, amarelo-canário, próximas entre si, concolor com pileo, margem lisa. Estipe cilíndrico, com a base alargada e enterrada no substrato, amarelo mais escuro que o pileo e lamelas, acima e abaixo do anel com escamas fibrilosas amarelas, 17 × 0,9–1,4 cm na base. Anel bem desenvolvido amarelo-claro na parte interna, amarelo-amarronzado na externa. Esporada branca. Basidiósporos ovóides a elipsóides, hialinos, de parede espessada, com poro de germinação

evidente, metacromáticos em azul de cresil, dextrinóides, $10,0\text{--}11,25 \times 6,25\text{--}7,5 \mu\text{m}$ ($Q = 1,54$). Basídios tetraesporados, muito frágeis, de visualização dificultada pois colapsam facilmente. Pleurocistídios ausentes. Queilocistídios de formato variado, abundantes, piriformes a lageniformes alongados, hialinos, de parede fina, $37,5\text{--}68,75 \times 7,5\text{--}27,5 \mu\text{m}$. Contexto com hifas hialinas, de parede levemente espessada, septadas, sem ansas, infladas, $3,75\text{--}12,5 \mu\text{m}$ diâm. Trama da lamela paralela, hialina, formada por hifas de parede fina, hialinas, septadas, sem ansas, $3,75\text{--}8,75 \mu\text{m}$ diâm. Superfície pilear indiferenciada, com hifas emaranhadas, parede fina, septadas, ramificadas, às vezes com terminações infladas, $6,25\text{--}17,5 \mu\text{m}$ diâm. Basidioma solitário, terrestre.

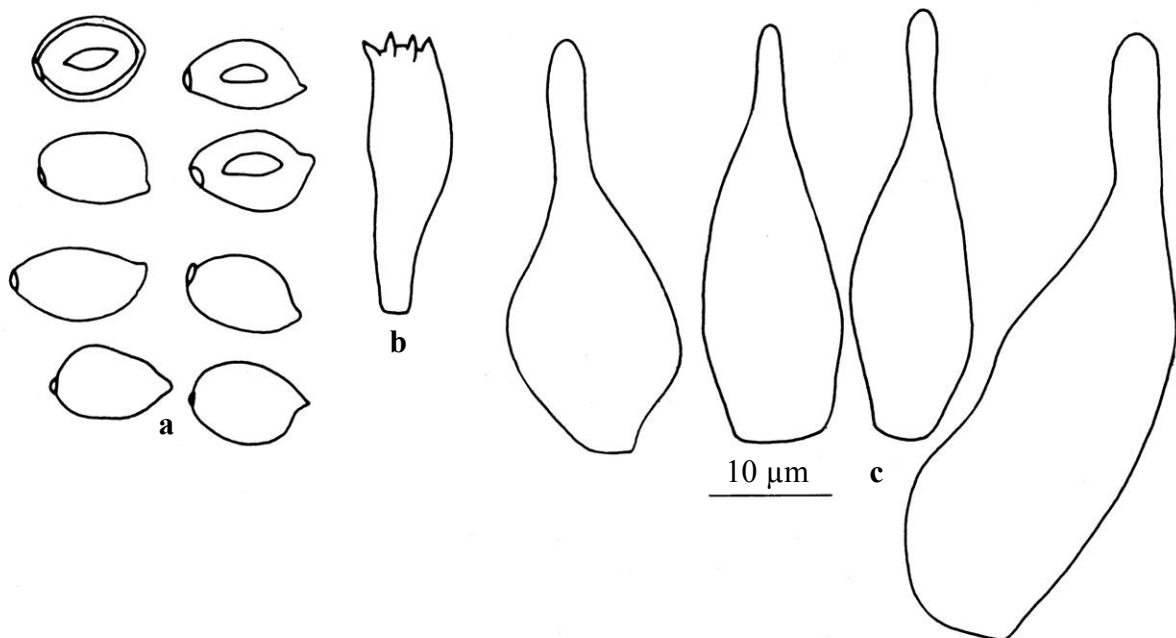


Figura 2 *Leucocoprinus birnbaumii*. a. Basidiósporos. b. Basídio. c. Queilocistídios.

Material examinado: BRASIL: SÃO PAULO: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, 798 m, III-1983, *B.M. Rodrigues* (SP178021); 20-XI-2003, *M. Capelari s.n.* (SP307927), 07-IV-2005, *L.J. Gimenes & U.C. Peixoto LJG 0115/05* (SP), 01-II-2005, *M. Capelari 4299* (SP).

Comentários: esta espécie é comum nas regiões tropicais e normalmente é encontrada em solos ricos em matéria orgânica, especialmente em substratos preparados para produção de mudas.

O exemplar SP307927 foi coletado em cupinzeiro abandonado e posteriormente ocupado por formigas. No Brasil, *Leucocoprinus birnbaumii* é mencionado para o Rio Grande do Sul (Rick 1907,1961) e São Paulo (Grandi *et al.* 1984, Pegler 1997), tendo com certeza uma distribuição mais ampla, faltando amostragem. A distribuição mundial inclui Venezuela (Dennis 1970), Sri Lanka (Pegler 1971), Quênia (Pegler 1977), Zaire (Heinemann 1977), Estados Unidos (Smith & Weber 1982), México (Guzmán-Dávalos & Guzmán 1982), Bermudas, Martinica, Tobago, Trinidad e Venezuela, (Pegler 1983). Dennis (1952) menciona esta espécie como *Lepiota lutea* (Bolt.: Secr.) Godfrin para Bahamas, Cuba, Trinidad e Tobago.

Os basidiósporos dos materiais coletados no PEFI são maiores que os citados por Pegler (1971, 1977, 1983) e Guzmán-Dávalos & Guzmán (1982). Heinemann (1977) menciona basidiósporos com dimensões próximas aos do PEFI, mas diferindo em relação à largura, $10,3-12,6 \times 6,7-8,5 \mu\text{m}$. Heinemann (1977) diz que os basidiósporos dos materiais africanos e europeus de *Leucocoprinus birnbaumii* são relativamente variáveis nas dimensões e também no formato, o que pode explicar a variação encontrada. Dennis (1970), Heinemann (1977), Guzmán-Dávalos & Guzmán (1982), Capelari (1989) e Pegler (1971, 1977, 1983, 1997) citam espécimes com píleo amarelo e escamas concolores. Os materiais do PEFI analisados e também os citados por Vellinga (2001) apresentavam píleo amarelo e escamas castanhas. As demais características, tanto macro quanto microscópicas, permitem determinar o material do PEFI como *Leucocoprinus birnbaumii*. Pegler (1997) cita dois materiais desta espécie coletados no PEFI, sendo que o exemplar SP214490 não foi localizado no Herbário SP e estudado apenas o SP178021.

2. *Leucocoprinus brebissonii* (Godey) Locq., Bull. Soc. Linn. Lyon 12: 41. 1943.

Basiônimo: *Lepiota brebissonii* Godey in Gillet, Hyménomycètes: 64. 1874.

Sinônimo de acordo com Pegler 1983.

Figuras 3 a-c, 10

Pileo cônico quando jovem a aplanado na maturidade, com o centro marrom, nem sempre diferenciado como umbo e estriado-sulcado em direção a margem, branco, recoberto com escamas fibrilosas marrons, margem ondulada, às vezes recurva, (2,2–) 4,1–5,3 cm de diâm. Lamelas livres, brancas, próximas entre si, com lamélulas, margem lisa. Estipe cilíndrico a ligeiramente alargado na base, branco, oco, fibroso, $9,5 \times 0,4\text{--}0,6$ cm. Anel branco, frágil, de posição superior à mediana. Esporada não observada. Basidiósporos elípticos, hialinos, de parede espessada, com poro de germinação, metacromáticos em azul de cresil, dextrinóides, $10,0\text{--}12,5 \times 7,5\text{--}8,75$ μm ($Q = 1,38$). Basídios clavados, hialinos, de parede fina, tetraesporados, $28,75 \times 7,5$ μm . Pleurocístídios ausentes. Queilocistídios clavados, hialinos, de parede fina, $22,5\text{--}43,75 \times 8,75\text{--}15$ μm . Contexto fino, hialino, formado por hifas hialinas, de parede fina, septadas, sem ansas, $2,5\text{--}7,5$ μm diâm. Trama da lamela regular, hialina, com hifas de parede fina, hialinas, septadas, sem ansas, infladas, $9,0\text{--}12,5$ μm diâm. Superfície pilear himeniforme, formada por elementos clavados, hialinos, de parede fina, $22,5\text{--}27,5 \times 11,5\text{--}15$ μm . Basidioma solitário, terrestre.

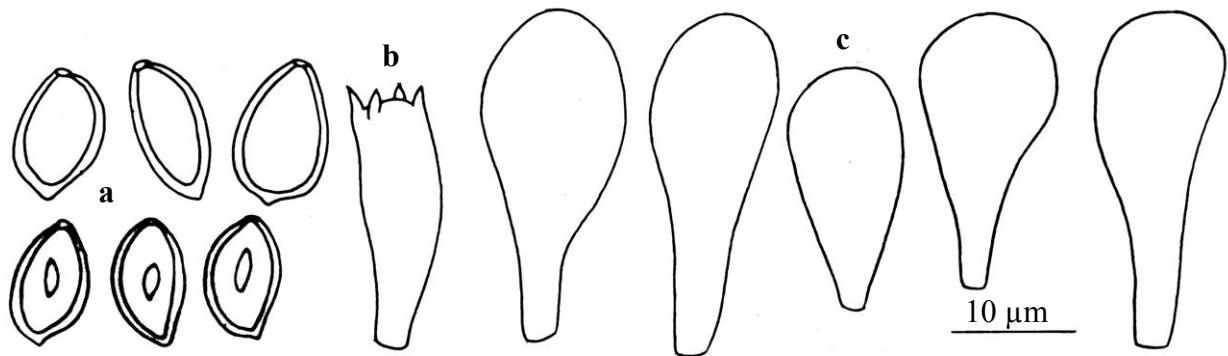


Figura 3. *Leucocoprinus brebissonii*. a. Basidiósporos. b. Basídio. c. Queilocistídios.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, 25-II-1986, *B.A Rocha* (SP194146), 29-XI-1985, *M.A. de Jesus* (SP194147); 20-I-1999, *M. Capelari & M.S. Dechoum 50* (SP); 23-X-2002, *M. Capelari & R. Braga Neto 4178* (SP); *M. Capelari & R. Braga Neto 4180* (SP); *M. Capelari & R. Braga Neto 4184* (SP); 16-II-2004, *L.J. Gimenes & col.*

LJG 058/04 (SP), 16-II-2004, L. J. Gimenes & col. LJG 059/04 (SP), 07-IV-2005, L.J. Gimenes & U.C.Peixoto LJG 0116/05 (SP), 06-V-2005, L.J. Gimenes LJG 0122/05 (SP).

Comentários: no Brasil, *Leucocoprinus brebissonii* é conhecido para Rondônia (Capelari & Maziero 1988), São Paulo (Capelari 1989, Pegler 1997) e Rio de Janeiro (Albuquerque 2006). A distribuição mundial da espécie abrange a Martinica (Pegler 1983), Itália (Candusso & Lanzoni 1990), Holanda (Vellinga 2001) e Guzmán-Dávalos & Guzmán (1992) ainda citam a ocorrência desta espécie para a Europa, África e Japão.

Pegler (1997) verificou que o material SP35408, citado por Bononi *et al.* (1981) como *Leucocoprinus cepistipes* é, na verdade, *L. brebissonii*. Como este material não foi localizado no Herbário SP, a identificação de Pegler (1997) não pôde ser confirmada.

No campo, a aparência macroscópica de *Leucocoprinus brebissonii* é muito semelhante a uma *Lepiota*, porém ao microscópio é reconhecido pela presença do poro de germinação dos basidiósporos, ausente em *Lepiota*. Dentre as espécies de *Leucocoprinus* do PEFI, *L. brebissonii* é facilmente reconhecida por ter o píleo com centro e escamas marrom-escuros que se destacam no píleo branco.

De modo geral os materiais estudados concordam bem com as descrições de Pegler (1983) e Vellinga (2001), exceto pelas dimensões dos queilocistídios e elementos da superfície pilear que são menores nos espécimes coletados. As dimensões de literatura para os queilocistídios são $45\text{--}60 \times 6\text{--}15 \mu\text{m}$ e $34\text{--}80 \times 8\text{--}18,5 \mu\text{m}$ e para os elementos da superfície pilear $25\text{--}70 \times 12\text{--}27 \mu\text{m}$ e $15\text{--}50 (70) \times 8\text{--}30 \mu\text{m}$ para Pegler (1983) e Vellinga (2001), respectivamente.

Pegler (1977) cita o exemplar SP194146 como *L. venezolanus*, mas através da observação das características microscópicas, como a dimensão dos basidiósporos, a dimensão dos queilocistídios e a configuração himeniforme da superfície pilear, conclui-se que este material é um exemplar de *L. brebissonii* e não de *L. venezolanus* quando confrontado com as descrições destas espécies existentes na literatura (Dennis 1961, Heinemann 1977, Pegler 1983). O material analisado

apresenta a seguinte descrição:

Pileo provavelmente branco com escamas marrom-acinzentadas, 4,2 cm de diâm. Lamelas livres, provavelmente brancas, muito próximas entre si, com lamélulas. Estipe cilíndrico a bulboso na base, 4,8 × 0,3 cm. Esporada não observada. Basidiósporos elípticos a ovóides, hialinos, de parede espessada, com poro de germinação, metacromáticos em azul de cresil, dextrinóides 10,0–11,25 × 6,25–7,5 µm (Q = 1,54). Basídios tetraesporados, de difícil visualização. Pleurocistídios ausentes. Queilocistídios piriformes a fusiformes, hialinos, de parede fina, 22,5–43,75 × 8,75–11,25 µm. Contexto fino, membranoso, com hifas hialinas, septadas, sem ansas, 3,75–7,5 µm. Trama da lamela regular, com hifas hialinas, de parede fina, septadas, sem ansas, 3,75–7,5 µm. Superfície pilear himeniforme, com elementos colapsados e hifas hialinas, infladas, septadas, sem ansas, 5,0–12,5 µm diâm. Basidioma solitário, terrestre.

As características macroscópicas aqui mencionadas foram resgatadas de forma precária da exsicata SP194146, não havendo qualquer anotação feita pelo coletor junto ao material.

Pegler (1997) menciona basidiósporos bem menores, de 6,5–8,5 × 4,0–5,5 µm, para *L. venezuelanus*, medidas exatamente iguais de materiais por ele anteriormente estudados da Martinica e Venezuela, incluindo o material tipo de Dennis (*Dennis 1156*, K) e a superfície superior como sendo indiferenciada com hifas subparalelas de 3–7 µm diâm. Heinemann (1977) também menciona basidiósporos menores para o material de *L. venezuelanus* coletado no Zaire, com dimensões de 7,5–9,5 × 6,0–7,5 µm, porém com superfície pilear himeniforme-celular no centro do píleo. Dennis (1961) na descrição original da espécie não menciona as características da superfície pilear e cita basidiósporos com 6–8 × 4–5 µm.

Assim, *Leucocoprinus venezuelanus* é uma espécie de *Leucocoprinus* com basidiósporos relativamente pequenos e com a superfície pilear não himeniforme considerando as descrições de Dennis (1961) e Pegler (1983) que analisaram o material tipo e o material do PEFI, portanto, a exsicata SP194146, não é um representante de *L. venezuelanus* e sim de *L. brebissonii*. As demais excicatas (SP214419 e SP214319) citadas por Pegler (1997) de *L. venezuelanus* para o PEFI, não

foram localizadas no herbário SP.

3. *Leucocoprinus brunneoluteus* Capelari & Gimenes, *Hoehnea* 31: 331-335. 2004.

Figuras 4 a-b, 15-16

Pileo subcônico quando jovem, depois convexo a aplanado-umbonado, amarelo-vivo, marrom-escuro no centro, com escamas marrom-escuras de distribuição concêntrica e diminuindo em quantidade em direção à margem, frágil, de consistência membranosa, estriado do centro em direção à margem, margem plicada-estriada, 1,2–4,5 cm diâm. Lamelas livres, remotas do estipe, amarelas, concolor com a superfície pilear, finas, próximas entre si, margem lisa. Estipe afilado no ápice, depois cilíndrico, finalmente expandido na base, levemente bulboso, amarelo, concolor com a superfície pilear e com as lamelas, oco, 3,5–9 × 0,2–0,7(1) cm. Anel superior, pouco desenvolvido, evanescente e praticamente ausente com a maturidade, amarelo-amarronzado. Esporada branca. Basidiósporos elíptico-ovóides a ovóides, hialinos, de parede espessada, com poro de germinação, recoberto por uma capa hialina, fracamente metacromáticos em azul de cresil, dextrinóides, 10–12 × 7–9 μm (Q = 1,38). Basídios não observados, provavelmente colapsados. Pleurocistídios ausentes. Queilocistídios abundantes, com formato variado, clavado, lageniforme a utrifforme, hialinos, de parede fina, às vezes espessada, normalmente formando fascículos na margem da lamela, 40–50 × 10–15 μm. Contexto muito fino, castanho, formado por hifas hialinas ou com pigmento vacuolar castanho, de parede fina, sem ansas, ramificadas, às vezes infladas, 3,0–16, 5 μm diâm. Trama da lamela irregular, hialina a levemente castanha, com hifas hialinas ou castanhas, de parede fina, sem ansas, às vezes infladas, 3–12 μm diâm. Superfície pilear himeniforme na região central, formada por elementos terminais ovóides a clavados, castanhos, de parede fina a levemente espessada, junto com hifas mais ou menos eretas, hialinas a castanho-claras, ramificadas, septadas, sem ansas, 4–10 μm diâm.e, no restante, formada por hifas prostradas, septadas, ramificadas, sem ansas, de parede

fina a levemente espessada, com conteúdo vacuolar castanho-claro, de ápice arredondado, 7–20 μm diâm.

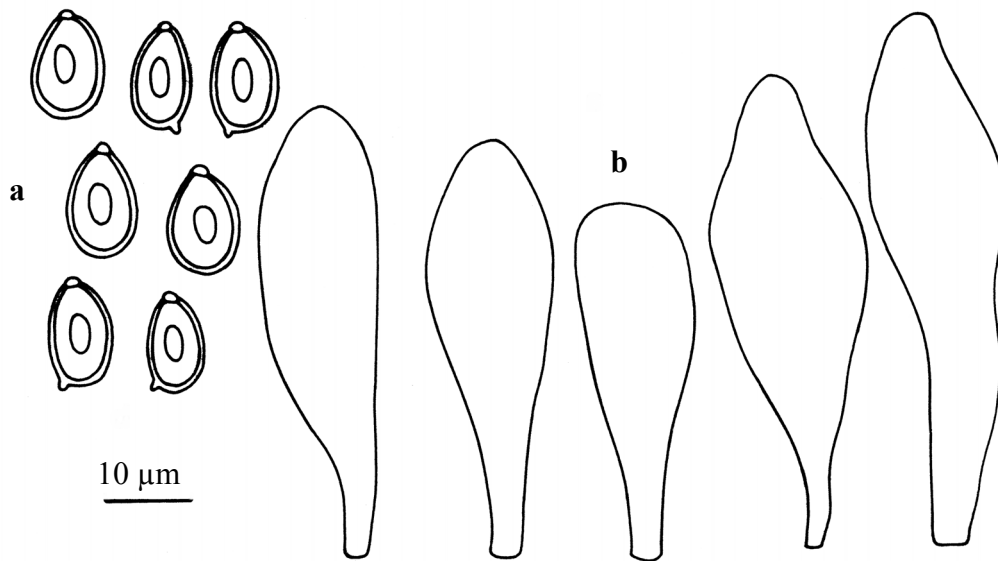


Figura 4. a. Basidiósporos. b. Queilocistídios.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, 25-IX-2001, *M. Capelari & col. 4144* (SP); 12-XII-2001, *U.C. Peixoto* (SP307880, holótipo), 20-II-2002, *M. Capelari & A.M. Gugliotta 4154* (SP); 19-III-2003, *M. Capelari 4238* (SP), 26-III-2003, *U.C. Peixoto* (SP307882).

Comentários: Esta espécie difere das outras espécies de *Leucocoprinus* com píleo amarelo pela presença de um umbo marrom-escuro e também das escamas marrons presentes na superfície do píleo. *Leucocoprinus birnbaumii* pode também apresentar o umbo e as escamas marrons, mas são marrom-claros e o píleo é amarelo-claro e não amarelo-vivo como em *L. brunneoluteus*. A consistência do basidioma de *L. birnbaumii* é carnosa e não membranácea como em *L. brunneoluteus*.

4. *Leucocoprinus cepistipes* (Sowerby: Fr.) Pat. sensu Candusso & Lanzoni, *Tabulae Analyticae Fungorum VII*, p. 45, 1889.

Basiônimo: *Agaricus cepaestipes* Sowerby, *Coloured Figures of English Fungi*, t. 2, 1797.

Agaricus cepaestipes Sowerby: Fr., *Systema Mycologicum I*, p. 280. 1821.

Lepiota cepaestipes (Sowerby: Fr.) Kummer, *Der Führer in die pilzkunde*, p. 136, 1871.

Mastocephalus cepaestipes (Sowerby: Fr.) O. Kuntze, *Revisio Gen. Plantarum 2*, p. 859, 1891.

Hiatula cepaestipes (Sowerby: Fr.) Heinem et Romagnesi, *Bulletin Soc. Myc. de France*, p. 184, 1934.

Sinônimos de acordo com Candusso & Lanzoni 1990

Figuras 5 a-c, 11

Pileo quando jovem campanulado, branco com algumas escamas castanhas e outras brancas. Centro superior do píleo castanho, levemente achatado, 2,6–2,8 cm. Quando maturo, umbonado, levemente rosado e ao ser tocado, torna-se esverdeado, escamas concolores. Lamelas livres, não tão distantes do estipe, próximas, brancas quando jovens e rosadas a acinzentadas quando maduras. Estipe cilíndrico, oco, brando, liso, 4,4–8,0 × 0,4–0,6 cm, anel superior presente. Contexto fino, com hifas hialinas, septadas, sem ansas, 6,5–7,5 µm. Esporada não observada. Basidiósporos elípticos, hialinos a levemente castanhos, com poro de germinação bem evidente, com ápulo, dextrinóides, metacromáticos em azul de cresil, 10,0–11,5 × 6,5–7,5 µm (Q = 1,54). Pleurocistídios ausentes. Queilocistídios clavados, hialinos, parede fina, 20-29 x 7,5-10,0 µm. Contexto fino, com hifas hialinas, septadas, sem ansas, 6,5–7,5 µm. Trama da lamela regular, com hifas hialinas, infladas, de parede fina, septadas, sem ansas, 5–6,25 µm. Revestimento do píleo himeniforme, com elementos colapsados, hifas hialinas, infladas, septadas, sem ansas, 6,5–12,5 µm. Basidioma gregário, no solo, sob árvore.

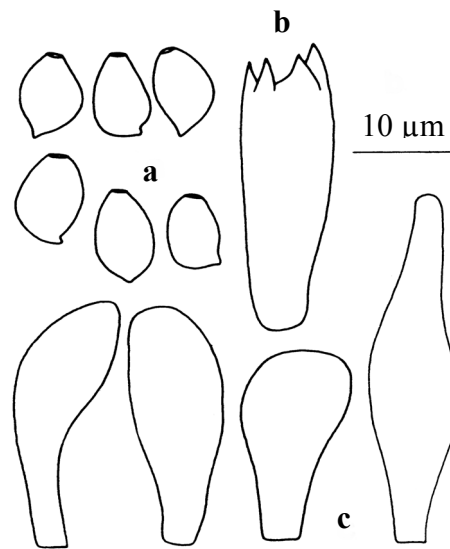


Figura 5. *Leucocoprinus cepistipes*. a. Basidiósporos. b. Basídio. c. Queilocistídios

Material examinado: BRASIL. São Paulo: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, 04-II-2005, *L.J. Gimenes & M. Capelari LJG 083/05* (SP); 15-II-2006, *L.J. Gimenes & M. Capelari LJG 0127/06* (SP).

Comentários: esta é a primeira citação da espécie para o PEFI e para o estado de São Paulo, pois os materiais citados por Bononi *et al.* (1981) e Capelari & Maziero (1988) como *L. cepistipes* são na verdade *L. cretaceus*. A distribuição mundial abrange a França (Heinemann 1977), México (Guzmán-Dávalos & Guzmán 1982) e Itália (Candusso & Lanzoni 1990).

A aparência macroscópica de coloração do píleo de *L. cepistipes* quando jovem é muito próxima de *L. brebissonii*, porém ao atingir a maturação diferencia-se por apresentar o píleo de coloração levemente rosada e ao ser tocado torna-se esverdeado e suas lamelas são concolores. *L. brebissonii* é facilmente reconhecido por apresentar o píleo com centro e escamas marrom-escuros que se destacam no píleo branco.

De uma maneira geral, os materiais analisados concordam com as descrições de Candusso & Lanzoni (1990), exceto pela dimensão dos basidiósporos e tamanho dos queilocistídios, onde citam

as dimensões para os esporos são $7,0-10,0-(12,0) \times (5,5)-6,0-7,2-(8,0) \mu\text{m}$ e para os queilocistídios $35-60-(70) \times 12-20 \mu\text{m}$. Vellinga (2001) considera *L. cepistipes* sensu L. Lange e diz que os basidiósporos são, como em várias espécies do gênero, variáveis em tamanho e formato, dependendo da idade e a condição de crescimento do basidioma. Afirma também, que há uma variação quanto a coloração do píleo, brancos com cinza-lilás a castanho acinzentado.

5. *Leucocoprinus cretaceus* (Bull.:Fr.) Locq. Bull. Mens. Soc. Linn. 14: 93. 1945.

Basiônimo: *Agaricus cretaceus* Bull., Herbar de la France 8: tab. 374. 1788.

Agaricus cretaceus Bull.: Fr., Syst. Mycol., Ind. gen.: 14. 1832.

Lepiota cretacea (Bull.: Fr.) Quéll., Fl. Mycol. France: 298. 1881.

Leucocoprinus cretatus Locq. ex Lanzoni in Atti XIX Com. Scient. Naz. Serina (Bergamo): 30-31. 1986.

Sinônimos de acordo com Vellinga 2001.

Figuras 6 a-b, 12

Píleo cônico, branco-alvo, completamente escamoso-flocoso quando jovem e no princípio da maturidade, tornando-se aplanado e praticamente glabro, com a queda das escamas, restando apenas algumas no centro, carnoso, margem nem sempre estriada, as vezes partida, 5,5 cm diâm. Lamelas livres, brancas, muito próximas entre si, com lamélulas. Estipe cilíndrico a levemente bulboso, branco puro a levemente amarelado, completamente escamoso, tornando-se glabro com o tempo, escamas permanecendo por mais tempo no bulbo, $4,5-5,0 \times 0,3-0,6$ cm. Anel branco, nem sempre presente, em posição superior. Esporada não observada. Basidiósporos elipsóides com apículo evidente, hialinos, de parede espessada, com poro de germinação pequeno, dextrinóides, metacromáticos em azul de cresil, $8,75-10,0 \times 5,0-6,25 \mu\text{m}$ ($Q = 1,66$). Basídios clavados, hialinos, de parede fina, abundantes, porém colapsam facilmente, tetraesporados, $17,5 \times 20,0(-25,0) \times 7,5-$

10,0 μm . Pleurocistídios ausentes. Queilocistídios abundantes, apendiculados, sésseis, lageniformes ou pedicelados, hialinos, de parede fina, 26,25–58,75 \times 8,75–15,0 μm . Contexto com hifas hialinas, parede fina, septadas, sem ansas, 2,5–5,0 μm diâm. Trama da lamela regular, formada por hifas hialinas, de parede fina, septadas, sem ansas, 3,75–7,5 μm diâm. Superfície pilear com hifas hialinas, de parede fina, septadas, sem ansas, 6,5–7,5 μm diâm. Basidioma gregário a cespitoso, terrestre.

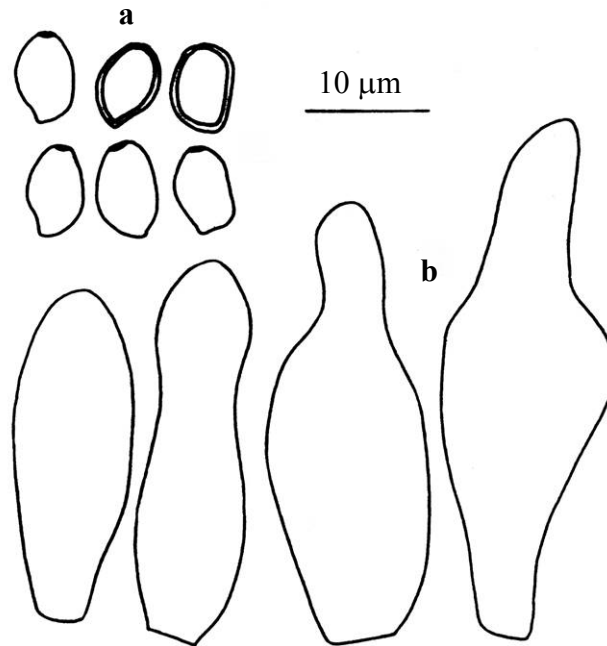


Figura 6. *Leucocoprinus cretaceus*. a. Basidiósporos. b. Queilocistídios.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, 23-II-1959, *T. Sendulsky* (SP35408), 10-XII-2002, *M. Capelari s.n.* (SP307934); 02-XII-2003, *L.J. Gimenes & Z.R.B. Santana s.n.* (SP307935), 01-II-2005, *M. Capelari & col. 4298* (SP), 11-IV-2005, *L.J. Gimenes LJG 0121/05* (SP).

Comentários: no Brasil, *Leucocoprinus cretaceus* foi citado inicialmente para o PEFI como *L. cepistipes* por Bononi *et al.* (1981) e Capelari & Maziero (1988) e foi registrado também para o Rio de Janeiro (Albuquerque, 2006). A distribuição mundial abrange Itália (Candusso & Lanzoni 1990, Vellinga 2001).

Dennis (1952, 1970) e Pegler (1977, 1983, 1986) identificaram as espécies brancas alvas com escamas flocosas concolores como *L. cepistipes*. Por outro lado, Vellinga (2001) adota a concepção da espécie de Lange (1935) e, desta forma, considera os materiais tropicais identificados por Dennis e Pegler como sendo *L. cretaceus* e não *L. cepistipes*, porém não descarta a ocorrência de *L. cepistipes* em regiões tropicais.

Dennis (1952) menciona que alguns autores consideram *L. cretaceus* como sinônimo de *L. cepistipes*, porém afirma que as duas espécies são distintas e que *L. cepistipes* parece ser uma daquelas espécies antigas estabelecidas que todos falam sobre ela, mas ninguém a conhece exatamente. Para Dennis (1952) a interpretação dada por Lange (1935) de *L. cepistipes* não é correta já que as ilustrações de Bulliard e as de Sowerby não representam a mesma espécie. A controvérsia permanecerá, pois o tipo de *L. cepistipes* não foi preservado.

Autores ingleses, por exemplo Pegler (1986), têm usado *Leucocoprinus cepistipes* para espécies brancas, mas *L. cretaceus* é o nome correto para estas espécies de acordo com Vellinga (2001). Candusso & Lanzoni adotam para as espécies brancas flocosa-pruinosas *Leucocoprinus cretatus*, grafia erroneamente usada.

6. *Leucocoprinus fragilissimus* (Rav.) Pat., Essai Taxon. p.171,1900.

Basiônimo: *Hiatula fragilissima* Rav. in Berk. & Curt., Ann. Mag. Nat. Hist. Ser. 2, 12: 422. 1853.

Agaricus licmophorus Berk. & Br. In Journ. Linn. Soc., Bot. 11: 500. 1871.

Lepiota licmophora (Berk. & Br) Sacc., Syll. Fung. 5: 44. 1871.

Mastocephalus licmophorus (Berk. & Br.) Kuntze, Rev. Gen. Pl. 2: 860. 1891.

Agaricus fragilissimus (Rav.) P. Henn. in Engl. & Prantl, NT. Pfl. 263. 1900.

Lepiota fragilissima (Rav.) Morgan in Journ. Mycol. 13: 5.1907.

Hiatula licmophora (Berk. & Br.) Petch in Ann. Roy. Bot. Grad., Peradeniya 4: 385. 1910.

Leucocoprinus licmophorus (Berk. & Br.) Pat. In Bull. Soc. Mycol. Fr. 29: 216. 1913.

Sinônimos de acordo com Pegler 1983.

Figuras 7 a-b, 13

Pileo cônico a parabólico, amarelo-canário quando jovem, parabólico a aplanado-umbonado quando expandido, branco, retendo a cor amarela no umbo, plicado-estriado, exceto no umbo, com escamas amarelas na superfície das estrias, que se soltam facilmente, não higrófono, muito frágil, 0,8–2,5 cm de diâm. Lamelas livres, brancas, próximas entre si, margem lisa. Estipe cilíndrico, branco, escamoso, escamas amarelas, 5–13 × 0,2–0,3 cm. Anel branco, frágil a evanescente, em posição superior. Esporada não observada. Basidiósporos elípticos a limoniformes, hialinos a levemente amarelados em KOH, de parede espessada, com poro de germinação, metacromáticos em azul de cresil, dextrinóides, 10,0–12,5 × 7,5–10,0 μm (Q= 1,29). Basídios clavados, hialinos, de parede fina, tetrasporados, 18-20 x 4,7-5,9 μm. Pleurocistídios ausentes. Queilocistídios não observados. Contexto muito fino, com poucas camadas de células. Trama da lamela paralela, hialina, formada por hifas de parede fina, hialinas, septadas, sem ansas, 4,7–5,9 μm. Superfície pilear com esferocistos hialinos, de parede fina, 25,0–32,5 × 17,5–36,25 μm. Basidioma solitário, terrestre.

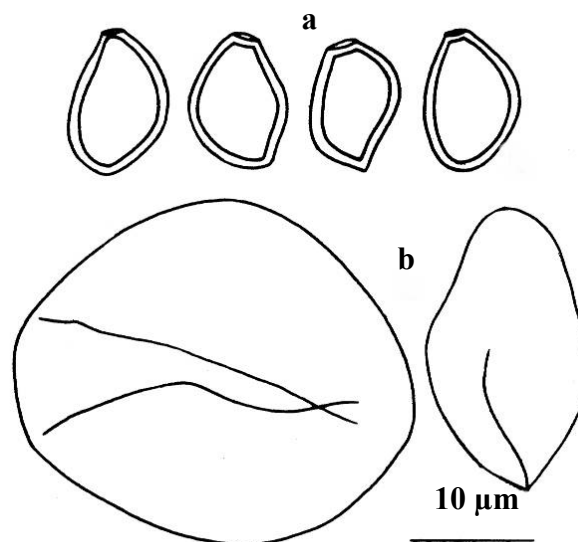


Figura 7. *Leucocoprinus fragilissimus*. a. Basidiósporos. b. Esferocistos.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, 23-X-2002, *M. Capelari* (SP307936); 19-XI-2002, *M. Capelari* MC 4213 (SP).

Comentários: no Brasil, *Leucocoprinus fragilissimus* foi citado para o Rio Grande do Sul (Rick 1961), São Paulo (Bononi *et al.* 1981, Capelari 1989, Pegler 1997), Rondônia (Capelari & Maziero 1988) e Rio de Janeiro (Albuquerque 2006). A distribuição mundial engloba, Estados Unidos (Pegler 1971, 1983, Heinemann 1977, Smith & Weber 1982), Sri Lanka (Pegler 1971, 1983), Tanzânia (Pegler 1977), Zaire (Heinemann 1977), Martinica (Pegler 1983), Cuba (Arnolds 1988), Índia (Das & Sinhá 1989), Itália (Candusso & Lanzoni 1990), Vietnã (Yang 2000).

L. fragilissimus é uma espécie facilmente reconhecida no campo pela fragilidade e delicadeza do basidioma e devido a essa fragilidade, há uma grande dificuldade em se coletar e preservar esta espécie na forma de exsicata. A descrição microscópica, com exceção dos basidiósporos e esferocistos da superfície do píleo apresentada na descrição, foi retirada de Capelari (1989) justamente pela dificuldade de preservação do material.

A exsicata SP60947 citada por Bononi *et al.* (1981) e Pegler (1997) como *L. fragilissimus* foi determinada por Singer como *Leucocoprinus* sp. aff. *fragilissimus*. Analisando o material foi verificado que os basidiósporos têm dimensões maiores que *L. fragilissimus*, medindo 11,5-15,0 x 7,5-10,0 µm. Na literatura consultada, duas espécies de *Leucocoprinus* têm basidiósporos com estas dimensões, *L. thoenii* Heinem. descrita do Zaire, com basidioma de coloração amarela e *L. tenellus* Pegler descrito da Costa Rica, com coloração creme-clara, centro marrom e escamas flocosas marrom-claras sobre as estrias do píleo. Pegler (1983) menciona que *L. tenellus* é obviamente próximo de *L. fragilissimus* e de *L. thoenii*, diferindo principalmente na coloração do basidioma e, como não há descrição macroscópica acompanhando a exsicata, não foi possível inferir a coloração do material coletado no PEFI e identificá-lo corretamente, uma vez que há discrepância na dimensão dos basidiósporos.

7. *Leucocoprinus* sp.

Figuras 8 a-c, 14

Píleo cônico a convexo, amarelo-canário-claro, completamente pruinoso, centro amarelo levemente mais escuro que o restante do píleo, estriado, 1-2 cm diâm. Lamelas livres, brancas a amarelo-canário mais claras que no píleo, finas, muito próximas entre si, margem lisa. Estipe bulboso, mais fino no ápice, alargando-se de forma homogênea até a base bulbosa, concolor com o píleo, pruinoso acima do anel. Anel bem desenvolvido, de posição superior à mediana, concolor com píleo e estipe, 3,3-6,0 x 0,2-0,3 cm. Esporada não observada. Basidiósporos elípticos, hialinos, de parede espessada, sem poro de germinação, metacromáticos em azul de cresil, levemente dextrinóides, 6,5-7,5 x 4,0-6,5 μm ($Q = 1,33$). Basídios tetraesporados, bem curtos, que se colapsam facilmente. Pleurocistídios ausentes. Queilocistídios clavados, hialinos, de parede fina, 12,5-26,5 x 8,75-10 μm . Contexto muito fino, de difícil visualização. Trama da lamela regular, com hifas bem soltas, hialinas, de parede fina, septadas, sem ansas, 3,75-6,25 μm . Superfície pilear formada por esferocistos abundantes, hialinos, de parede levemente espessada, 18,75-32,5 x 22,5-23,75 μm . Basidioma cespitoso a gregário.



Figura 8. *Leucocoprinus* sp. a. Basidiósporos. b. Esferocistos. c. Queilocistídios

Material examinado: BRASIL. São Paulo: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, 07-

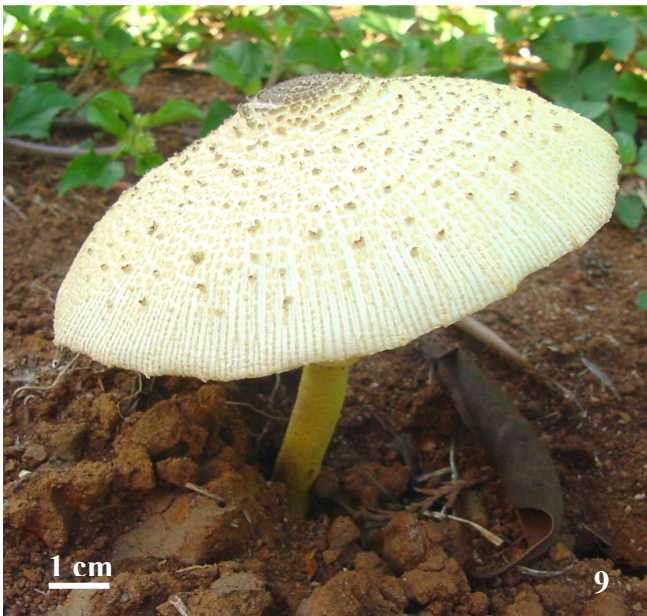
XI-2002, *M. Capelari & U.C. Peixoto s.n.* (SP307940); 02-XII-2003, *M. Capelari & Z.R.B Santana s.n.* (SP307941).

Comentários: são poucas as espécies de *Leucocoprinus* descritas que não possuem poro de germinação nos basidiósporos e pela literatura a espécie mais semelhante do material estudado é *L. flavus* (Beeli) Heinem. Heinemann (1977) descreve *L. flavus* com basidioma de coloração amarelo-limão vivo com o centro alaranjado e lamelas serrilhadas, o que não ocorre em *Leucocoprinus* sp. Os basidiósporos em *L. flavus* são longo-elipsóides, medindo $5,8-7,8 \times (3,2)3,4-4,0 \mu\text{m}$, os queilocistídios são maiores, pseudoparáfises são freqüentes e não ocorrem esferocistos na superfície superior. No material do PEFI, os basidiósporos são elípticos diferindo, principalmente na largura, pseudoparáfises não foram observadas, os queilocistídios são menores e os esferocistos são abundantes.

Comparando com a descrição de *L. flavus* fornecida por Smith & Weber (1982), o material do PEFI difere na coloração que é mais clara que a mencionada, os basidiósporos são ligeiramente mais estreitos que os citados de $(6-7,5-9,0 \times 3,8-5,3 \mu\text{m})$ e com a parede homogeneamente espessada, os queilocistídios são menores (Smith & Weber 1982 mencionam queilocistídios de $33-49 \times 7-11 \mu\text{m}$) e também pela presença dos esferocistos.

Algumas espécies de *Leucocoprinus* podem ser confundidas com espécies de *Lepiota* principalmente por pertencerem ao grupo que não apresentam poro de germinação nos basidiósporos. Para ter certeza de que *Leucocoprinus* sp. não era de fato uma espécie de *Lepiota*, apesar da reação metacromática dos basidiósporos, algumas seqüências do gene nLSU deste último gênero depositadas no Genbank e seqüências de *Leucocoprinus* do PEFI foram analisadas e *Leucocoprinus* sp. segregou com as demais espécies de *Leucocoprinus* e não com *Lepiota*. Portanto, descartou-se a hipótese de *Leucocoprinus* sp. ser uma espécie de *Lepiota*.

A partir dos estudos taxonômicos e moleculares, supõe-se que *Leucocoprinus* sp. seja uma espécie nova no grupo com basidiósporos sem poro de germinação e será proposta como nova para a ciência.



Figuras 9-14: 9. *Leucocoprinus birnbaumii*, 10. *L. brebissonii*, 11. *L. cepistipes*, 12. *L. cretaceus*, seta indicando as escamas caídas do píleo, 13. *L. fragilissimus*, 14. *Leucocoprinus* sp.
Fotos: M. Capelari



Figuras 15-16: *Leucocoprinus brunneoluteus*. Fotos: M. Capelari

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Maurício Bacci Junior, M.Sc. Giovana Gonçalves Vinha e Marcelo de Lima Marchesin, da UNESP de Rio Claro, pela ajuda nas análises filogenéticas e a FAPESP pelo apoio financeiro (processo FAPESP 04/04319-2).

Literatura citada

- Akers, B.P., Angels, S.A. & Kimbrough, W.** 2000. *Leucoagaricus viridiflavoides*, a new species from Florida, with notes on related taxa. *Mycotaxon* 76: 39-50.
- Albuquerque, M. P.** 2006. Fungos Agaricales em trechos de Mata Atlântica da Reserva Biológica do Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Arnolds, G.R.W.** 1988. Contribution to the study of the fungi of Cuba. IV. *Feddes Repertorium* 99: 27-31.
- Bicudo, D.C., Forti, M.C. & Bicudo, C.E.M.** 2002. Parque Estadual das Fontes do Ipiranga: unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, São Paulo.
- Bononi, V.L.R., Trufem, S.F.B., Grandi, R.A.P.** 1981. Fungos macroscópicos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil, depositados no Herbário do Instituto de Botânica. *Rickia* 9: 37-53.
- Candusso, M. & Lanzoni, G.** 1990. *Lepiota* s.l.- Fungi Europaei. Libreria Giovanna Biella, Saronno.
- Capelari, M.** 1989. Agaricales do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (exceto Tricholomataceae). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Capelari, M. & Maziero, R.** 1988. Fungos macroscópicos do estado de Rondônia: região dos rios

Jaru e Ji-Paraná. Hoehnea 15: 28-36.

- Das, M.K. & Sinhá, M.P. 1989.** *Leucocoprinus fragilissimus* (Berk. & Br.) Pat., a new find in Orissa, India. Curriculum Science 58: 396-397.
- Dennis, R.W.G. 1952.** *Lepiota* and allied genera in Trinidad, British West Indies. Kew Bulletin 7: 459-499.
- Dennis, R.W.G. 1961.** Fungi Venezuelani: IV. Agaricales. Kew Bulletin 15: 67-156.
- Dennis, R.W.G. 1970.** The fungus flora of Venezuela and adjacent countries. Kew Bulletin Additional Series 3: 1-531.
- De Vuono, Y. S. 1985.** Fitossociologia do estrato arbóreo da floresta da Reserva Biológica do Instituto de Botânica (São Paulo, SP). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1996.** Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: Embrapa – Cenargen.
- Felsenstein, J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Fonseca, M.P. 1999.** Aphyllophorales lignocelulíticos da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Grandi, R.A.P., Guzmán, G. & Bononi, V.L. 1984.** Adições às Agaricales (Basidiomycetes) do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. Rickia 11: 27-33.
- Guzmán-Dávalos, L. & Guzmán, G. 1982.** Contribución al conocimiento de los Lepiotáceos (Fungi) de Quintana Roo. Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología 17: 43-54.
- Heinemann, P. 1977.** *Leucocoprinus* (Agaricaceae)- Flore illustrée des champignons d' Afrique Centrale, v.5, pp 87-104.
- Johnson, J. 1999.** Phylogenetic relationships within *Lepiota sensu lato* based on morphological and molecular data. Mycologia 91: 443-458.
- Johnson, J. & Vilgalys, R. 1998.** Phylogenetic systematics of *Lepiota sensu lato* based on nuclear

large subunit rDNA evidence. *Mycologia* 90: 971-979.

- Kirk, P., Canon, P.F., David, J.C. & Stalpers, J.A.** 2001. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi*. CAB International, Wallingford.
- Lange, J.** 1935. *Flora Agaricina Danica* vol.1. *In Flora Agaricina Neerlandica: critical monographs on families of agarics and boleti occurring in the Netherlands* (M.E. Noordeloos, T.W. Kuyper & E.C. Vellinga, eds.), A.A.Balkema Publishers, Lisse, v.5, pp 76-84.
- Largent, D.L., Johnson, D. & Watling, R.** 1986. *How to identify mushrooms to genus. III. Microscopic features*. Mad River Press, Eureka.
- Moncalvo, J.-M., Vilgalys, R., Redhead, S.A., Johnson, J.E., James, T.Y., Aime, M.C., Hofstetter, V., Verduin, S.J.W., Larsson, E., Baroni, T.J., Thorn, R.G., Jacobsson, S., Clémenco, H. & Miller Jr., O.K.** 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 357-400.
- Pegler, D.N.** 1971. A revision of the genus *Lepiota* from Ceylon. *Kew Bulletin* 27: 155-202.
- Pegler, D.N.** 1977. A preliminary Agaric Flora of East Africa. *Kew Bulletin Additional Series* 6: 1-615.
- Pegler, D.N.** 1983. Agaric flora of the Lesser Antilles. *Kew Bulletin Additional Series* 9: 1-668.
- Pegler, D.N.** 1986. Agaric Flora of Sri Lanka. *Kew Bulletin Additional Series* 12: 1-519.
- Pegler, D.N.** 1997. *The agarics of São Paulo, Brazil*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Rick, J.** 1907. *Contributio ad monographiam Agaricearum et Polyporacearum brasiliensium*. *Broteria* 6: 65-92.
- Rick, J.** 1961. Basidiomycetes eubasidii in Rio Grande do Sul - Brasilia. 5. Agaricaceae. *Iheringia, Série Botânica* 8: 296-450.
- Singer, R.** 1975. *The Agaricales in Modern Taxonomy*. 3rd ed. Vaduz, J. Cramer.
- Singer, R.** 1986. *The Agaricales in modern taxonomy*. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Smith, H.V. & Weber N.S.** 1982. Selected species of *Leucocoprinus* from Southeastern United States. *Contributions from the University of Michigan Herbarium* 15: 297-309.
- Swofford, D.L.** 2002. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Vellinga, E.C.** 2001. *Leucocoprinus* Pat. In *Flora Agaricina Neerlandica: critical monographs on families of agarics and boleti occurring in the Netherlands* (M.E. Noordeloos, T.W. Kuyper & E.C. Vellinga, eds.), A. A. Balkema Publishers, Lisse, v.5, pp 76-84.
- Vellinga, E.C.** 2004. Genera in the family Agaricaceae: evidence from nrITS and nrLSU sequences. *Mycological Research* 108: 354-377.
- Yang, Z.-L.** 2000. Type studies on agarics described by N. Patouillard (and his co-authors) from Vietnam. *Mycotaxon* 75: 431-476.

CAPÍTULO 4

Os gêneros *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* (Agaricaceae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil

Luciana Jandelli Gimenes¹, Milena de Luna Alves Lima², Ricardo Harakava³ e Marina Capelari²

1. Instituto de Botânica, Seção de Micologia e Liquenologia, Caixa Postal 3005, 01061-970, São Paulo, SP, Brasil. E-mail:

lujandelli@iron.com.br (autora para correspondência)

2. Pesquisadora Científica, Instituto de Botânica, Seção de Micologia e Liquenologia

3. Pesquisador Científico, Instituto Biológico, Laboratório de Bioquímica Fitopatológica

ABSTRACT - (*Chlorophyllum* and *Macrolepiota* (Agaricaceae) from Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brazil). This study describes the species of *Chlorophyllum* and *Macrolepiota* from Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) with descriptions, illustrations, an identification key and relevant comments as well as the filogenetic relationships of the genera, using the nLSU rDNA region. Using molecular analyses, *Macrolepiota pulchella* will be transferred to the genera *Chlorophyllum* (*C. pulchellum* Gimenes & Capelari, comb. nov.). *M. bonaerensis* and *M. mastoidea* were analyzed and confirmed in herbarium and the other species that were found were *C. molybdites*. and *Macrolepiota* sp., which is a new species to science.

Key words: Phylogeny, tribe Leucocoprineae, nLSU rDNA, taxonomy

RESUMO – (*Chlorophyllum* e *Macrolepiota* (Agaricaceae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil). Este trabalho reporta as espécies dos gêneros *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* que ocorrem no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), apresentando descrições, ilustrações, chave de identificação e comentários pertinentes bem como as relações filogenéticas dos gêneros, usando a região LSU rDNA. A partir de análises moleculares, *Macrolepiota pulchella* será transferida para o gênero *Chlorophyllum* (*C. pulchellum* Gimenes & Capelari, comb. nov.). Foram analisadas e confirmadas *M. bonaerensis* e *M. mastoidea* que estavam depositadas no herbário e as demais espécies encontradas foram *C. molybdites* e *Macrolepiota* sp., que constitui uma espécie nova para a ciência.

Palavras-chave: Filogenia, tribo Leucocoprineae, nLSU rDNA, taxonomia

Introdução

De acordo com Singer (1986) os gêneros *Chlorophyllum* Masee e *Macrolepiota* Singer estão inseridos na família Agaricaceae, tribo Leucocoprineae juntamente com os gêneros *Clarkeinda*, *Leucoagaricus*, *Leucocoprinus*, *Sericeomyces* e *Volvolepiota*.

Chlorophyllum e *Macrolepiota* são muito similares e macroscopicamente caracterizam-se por possuir pileo convexo a aplanado, lamelas livres e remotas do estipe, com base bulbosa no estipe, anel presente e bem evidente. Ao microscópio, apresentam basidiósporos com parede espessada e grandes, poro de germinação presente, dextrinóides, metacromáticos em azul de cresil, queilocistídios presentes e pleurocistídios ausentes. Quanto ao hábito, normalmente solitário a disperso, saprófito e terrestre (Vellinga 2001).

Vellinga (2002) afirma que algumas características morfológicas são muito importantes para distinguir estes dois gêneros. *Macrolepiota* s. str. é caracterizado por apresentar superfície pilear tricodérmica, presença de uma cobertura visível no estipe com bandas coloridas e basidiósporos com o ápice arredondado com cobertura hialina sobre o poro de germinação. O gênero *Chlorophyllum* apresenta superfície pilear himenodérmica, estipe liso, esporos com ou sem poro de germinação, sem capa hialina e hábito variando de agaricóide a secotióide.

Algumas espécies podem causar problemas gastro-intestinais (Singer 1986), como é o caso de *Chlorophyllum molybdites* (Meyer: Fr.) Masee e outras são comestíveis, como *M. procera* e *C. rhacodes*, consideradas excelentes para o consumo, mas não são cultivadas em escala comercial.

A delimitação de tribos e gêneros da família Agaricaceae como proposta por Singer (1986) vem sendo questionada através de estudos tanto morfológicos como moleculares (Johnson & Vilgalys 1998, Moncalvo *et al.* 2002, Vellinga 2003, Vellinga *et al.* 2003). De acordo com Moreno *et al.* (1995), há uma grande similaridade macro/microscópica de *Chlorophyllum* com *Macrolepiota*, onde transferem *Chlorophyllum molybdites* (Meyer: Fr.) Masee para *Macrolepiota* e propõem uma nova seção *Chlorophyllum* em *Macrolepiota* para acomodar a espécie, proposta não

válida. Um reestudo das definições morfológicas de *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* foi proposto por Vellinga (2002) e também 13 novas combinações em *Chlorophyllum*. Sete espécies de *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* foram listadas para a Austrália por Vellinga (2003), onde duas espécies eram novas, *C. nothorachodes* Vellinga & Lepp e *M. eucharis* Vellinga & Halling. *C. hortense* (Murrill) Vellinga foi adotado como nome para *Leucoagaricus fimetarius* (Cooke & Masee) Aberdeen e *C. brunneum* (Farl. & Burt.) Vellinga é o nome correto para as espécies frequentemente referidas na Austrália como *M. rachodes*. Vellinga (2004) examinou a circunscrição da família Agaricaceae e as relações entre gêneros através de análises de seqüências de ITS e LSU resultando em exclusões e reorganizações. A tribo Agariceae foi considerada monofilética, o clado de *Agaricus* é um clado irmão de *Chlorophyllum* e a tribo Leucocoprineae é polifilética com *Macrolepiota* sensu Singer (1986) e está dividida em dois clados.

Em relação aos trabalhos publicados no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, Bononi *et al.* (1981) listaram os fungos macroscópicos coletados no PEFI e depositados no Herbário SP, onde mencionam *Volvolepiota brunnea* (Rick) Singer, sinônimo de *Macrolepiota pulchella* de Meijer & Vellinga. Grandi *et al.* (1984) adicionaram ao trabalho anteriormente publicado por Bononi *et al.* (1981) mais três espécies dos gêneros *Chlorophyllum* e *Macrolepiota*, *C. molybdites* (Meyer: Fr.) Masee, *M. bonaerensis* (Speg.) Singer e *M. mastoidea* (Fr.) Singer e Pegler (1997) num trabalho em forma de chave de identificação, confirmou as espécies *C. molybdites* e *M. bonaerensis*.

O presente trabalho tem como objetivo fazer um levantamento dos fungos dos gêneros *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, com base em estudos taxonômicos e moleculares.

Material e Métodos

O Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) é uma reserva florestal urbana, situado na zona sul da cidade de São Paulo (23°39'S e 46°37'W), com altitude média de 798 m, ocupando uma

área total de 549,31 ha, dos quais 162,69 ha estão sob responsabilidade do Instituto de Botânica. Informações a respeito da estrutura da vegetação, clima e solo podem ser encontradas em De Vuono (1985) e Bicudo *et al.* (2002).

Coletas no parque foram realizadas duas vezes por mês, de setembro de 2004 a março de 2005 e esporádicas nos meses restantes de 2005 e 2006 em função da temperatura e da umidade relativa. Foram revisados os materiais já depositados no Herbário SP e analisados também os já coletados e ainda não identificados.

Na coleta, os materiais foram fotografados e colocados individualmente em sacos de papel. No laboratório foram descritos macroscopicamente e, então secos em estufa entre 45-50 °C. Sempre que possível, foi obtida esporada e fragmentos do material foram liofilizados para os estudos de análise molecular.

Para a análise microscópica, foram feitos cortes a mão livre, transversais ao píleo e lamela (Largent *et al.* 1986). O material foi reidratado em álcool 70% e montado entre lâmina e lamínula com KOH 4% (Martin 1934 *In* Fonseca 1999). Reagente de Melzer (Singer 1975) e azul de cresil (Largent *et al.* 1986) foram utilizados para as reações de amiloidia e metacromatismo, respectivamente. As observações e medidas foram realizadas em microscópio Olympus BX50 com aumento de 800 vezes. As estruturas microscópicas foram desenhadas com auxílio da câmara-clara acoplada ao microscópio. As medidas representam os valores mínimos e máximos de cada estrutura e o índice Q foi obtido pela média do comprimento e da largura dos esporos.

Para cada espécie são apresentados descrições, ilustrações, distribuição geográfica e comentários pertinentes, além de uma chave de identificação para as espécies presentes no parque.

Para a análise molecular, a extração foi realizada a partir de basidiomas frescos, herborizados, liofilizados ou de culturas e seguiu-se o protocolo para extração de DNA, segundo Ferreira & Grattapaglia (1996).

Os materiais utilizados foram submetidos à reação de polimerização em cadeia (PCR) e utilizados os iniciadores específicos, LR0R, LR3R, LR7 e LR16

(www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/) para amplificação do gene nLSU rDNA. Os ciclos do termociclador nas reações de PCR consistiram em três etapas: (etapa 1) desnaturação inicial a 40°C, 2 min, 92°C, 5 min.; (etapa 2) 92°C, 40 s, 40°C, 1,5 min., 72°C, 2 min. A etapa 2 é repetida 40 vezes; (etapa 3) extensão final, 72°C, 5 min. O produto de amplificação gerado foi purificado utilizando o *Pure Link PCR Purification*TM (Invitrogen). O seqüenciamento foi realizado com o seqüenciador automático modelo ABI 377 com o kit *BigDye*TM *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems Co.) e os mesmos iniciadores usados para a reação de PCR, de acordo com as instruções do fabricante. Foram efetuadas várias repetições de reações de cada uma das amostras, com intuito de conseguir seqüências bem definidas para facilitar o posterior alinhamento. Nas amostras em que não se obteve uma boa seqüência, foi efetivada uma seqüência de consenso de todas as repetições das amostras.

As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências já disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Após, as seqüências foram editadas com o programa BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html) e retirados os “gaps”. O alinhamento foi realizado com o programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994) de todas as seqüências obtidas com as seqüências selecionadas no GenBank dos gêneros *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* (tabela 1) referentes às regiões 25S e 28S e também seqüências já publicadas (Johnson & Vilgalys 1998, Johnson 1999, Vellinga 2004).

Análise de parcimônia máxima foi escolhida como critério de otimização e busca heurística, usando o programa PAUP* versão 4.0b10 (Swofford 2002). Todos os caracteres foram considerados como não ordenados, com pesos iguais para as mudanças. *Lepiota cristata* (Bolt.: Fr.) Kumm. foi escolhida como grupo externo. Análises de “bootstrap” (Felsenstein 1985) com 1000 replicações foram implementadas para verificação da robustez dos ramos em cada conjunto de dados.

Tabela 1. Espécies de *Chlorophyllum* e *Macrolepiota* do PEFI e nº de acesso das espécies importadas do GenBank das seqüências de nLSU rDNA. Grupo externo: *Lepiota cristata*.

Espécies	Herbário	Local de Origem	Nº de acesso no GenBank	Referência
<i>Lepiota cristata</i>	–	E.U.A.	U85292	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>C. brunneum</i>	–	E.U.A.	AF482886	Vellinga <i>et al.</i> (2003)
<i>C. molybdites</i>	SP375868	Brasil	–	Este trabalho
<i>C. molybdites</i>	–	E.U.A.	U85274	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>C. molybdites</i>	–	Colômbia	U85303	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>C. hortense</i>	–	E.U.A.	U85284	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>C. pulchellum</i>	SP381604	Brasil	–	Este trabalho
<i>C. rachodes</i>	–	E.U.A.	U85277	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>M. bonaerensis</i>	*	Brasil	–	–
<i>M. clelandii</i>	–	Austrália	AF482882	Vellinga (2004)
<i>M. colombiana</i>	–	Colômbia	U85276	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>M. dolichaula</i>	–	Austrália	AF482883	Vellinga <i>et al.</i> (2003)
<i>M. dolichaula</i>	–	Alemanha	DQ411537	Walther <i>et al.</i> (2005)
<i>M. gracilentia</i>	–	França	U85279	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>M. cf. konradii</i>	–	Alemanha	AY207232	Walther <i>et al.</i> (2005)
<i>M. mastoidea</i>	*	Brasil	–	–
<i>M. mastoidea</i>	–	Alemanha	AY207231	Walther <i>et al.</i> (2005)
<i>M. procera</i>	–	Holanda	AF482880	Vellinga <i>et al.</i> (2003)
<i>M. procera</i>	–	Alemanha	U85275	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>M. procera</i>	–	Alemanha	AY207233	Walther <i>et al.</i> (2005)
<i>M. procera</i>	–	E.U.A.	U85304	Johnson & Vilgalys (1998)
<i>Macrolepiota</i> sp.	SP381601	Brasil	–	Este trabalho
<i>Macrolepiota</i> sp.		Japão	AF482884	Vellinga <i>et al.</i> (2003)
<i>Macrolepiota</i> sp.		E.U.A.	AF482881	Vellinga <i>et al.</i> (2003)

* Não foi conseguido extrair DNA.

Resultados e discussão

Foram encontradas no PEFI *Chlorophyllum pulchellum* (de Meijer & Vellinga) Gimenes & Capelari e *Macrolepiota* sp. e já havia sido citada *C. molybdites* (Meyer: Fr.) Masee. Foram analisadas e confirmadas *M. bonaerensis* (Speg.) Singer e *M. mastoidea* (Fr.) Singer que estavam depositadas no Herbário SP.

Resultados moleculares

O tamanho do gene nLSU rDNA das espécies estudadas de *Chlorophyllum* e *Macrolepiota*, variaram de 670 a 700 pares de bases (pb) e as seqüências do GenBank variaram de 1030 a 1155 pb. Após remover os extremos das seqüências, 469 caracteres foram excluídos, permanecendo 633 caracteres dos quais 566 eram constantes e 41 caracteres variáveis não informativos. Todos os caracteres foram considerados como não ordenados, com pesos iguais para as mudanças. Resultados usando simples adição de seqüências, os algoritmos de “branch-swapping” tree bisection-reconnection (TBR) e MAXTREES produziram uma árvore mais parcimoniosa (figura 1), com 99 passos, com índice de consistência (CI) = 0,7071 e índice de retenção (RI) = 0,6234.

As árvores geradas por máxima parcimônia não tiveram muita variação nos clados, concluindo-se que o gene nLSU não foi um marcador eficiente para o gênero *Macrolepiota*, com seqüências muito semelhantes, portanto uma região muito conservada e pouco informativa, o que ocasionou várias politomias. Em relação ao gênero *Chlorophyllum*, conclui-se que o gene nLSU apresentou melhores resultados do que para *Macrolepiota*.

Para *Chlorophyllum* o gene nLSU foi informativo e todas as espécies do gênero foram agrupadas com um suporte de 77%. No ramo A₁, com 52% de suporte de “bootstrap”, *C. pulchellum* Gimenes & Capelari, comb. nov., agrupou com *C. rachodes* e *C. brunneum* (83%). Como *C. pulchellum* segregou com as demais espécies do gênero *Chlorophyllum*, foi necessário um

reestudo morfológico, principalmente quanto à microscopia, e constatou-se que esta espécie apresentava superfície pilear himenodérmica como as espécies de *Chlorophyllum*. Portanto, os estudos morfológicos complementados com os moleculares verificaram que *M. pulchella*, na realidade, é uma espécie de *Chlorophyllum* sendo então, proposta uma combinação nova, *C. pulchellum* (de Meyer & Vellinga) Gimenes & Capelari, comb. nov. No ramo A₂ houve um agrupamento de 98% das duas espécies de *C. molybdites* do GenBank e da espécie do PEFI. Confirmou-se, portanto, a espécie do PEFI como *C. molybdites*.

Em relação à *Macrolepiota* sp., houve um agrupamento com baixo valor de “bootstrap” (51%) com *M. colombiana*, a qual é originária da Colômbia e também de clima tropical. *Macrolepiota* sp. provavelmente é uma espécie nova, de acordo com os caracteres morfológicos.

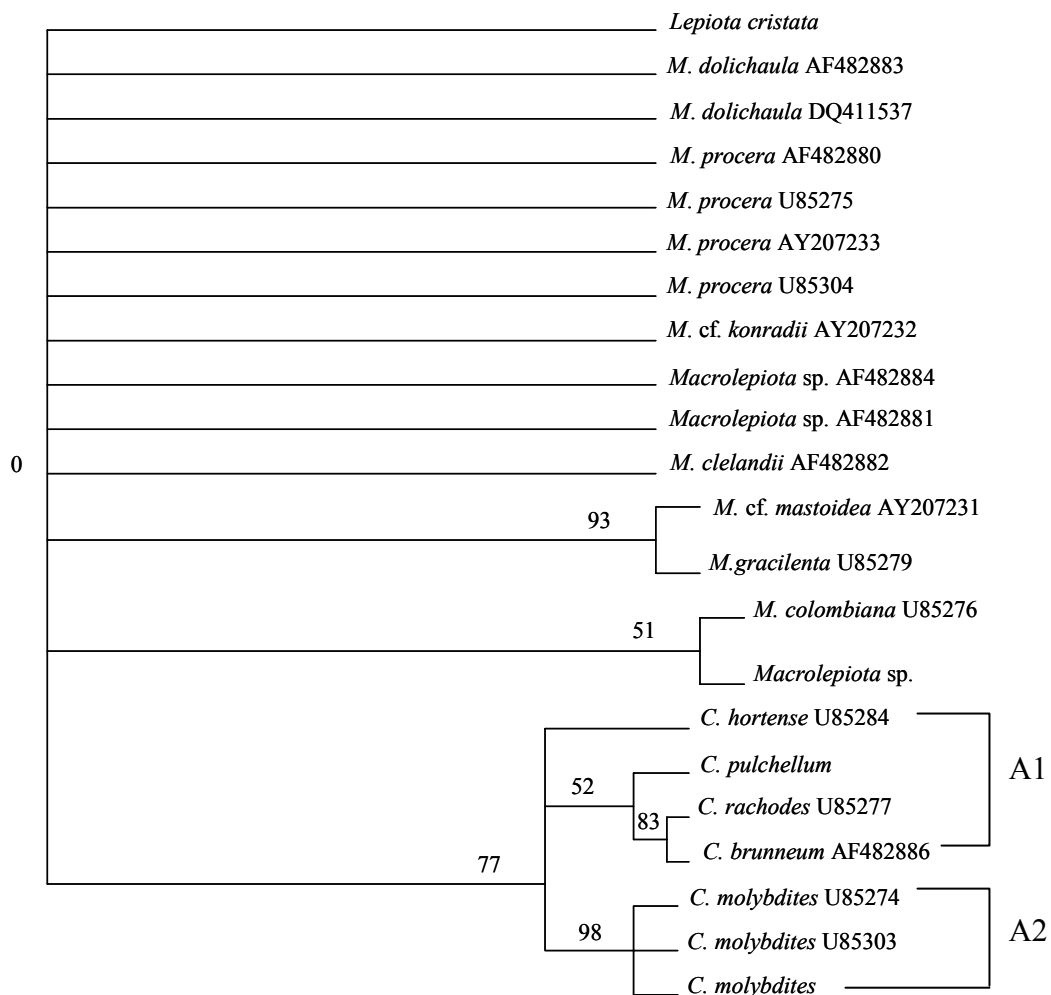


Figura 1. Árvore filogenética de máxima parcimônia. Os valores de “bootstrap” para o método de MP (1000 replicações) são em porcentagens e estão marcados nos ramos. Foi obtida 01 árvore mais parcimoniosa, com índice de consistência (CI) = 0,7071 e índice de retenção (RI) = 0,6234.

Resultados taxonômicos

Chave de identificação

1. Superfície pilear himenodérmica 2
1. Superfície pilear tricodérmica 3
2. Esporada branca, presença de volva2. *Chlorophyllum pulchellum*
2. Esporada verde, ausência de volva1. *C. molybdites*
3. Escamas adpressas3. *Macrolepiota bonaerensis*
3. Escamas fibrilosas 4
4. Esporos elípticos, com poro de germinação truncado, 14–15 x 9,0–10,0 µm, queilocistídios clavados 27,5–44,0 x 11,5–17,5 µm5. *Macrolepiota* sp.
4. Esporos elípticos, com poro de germinação não truncado, 15–16,25 x 8,75–10,0 µm, queilocistídios clavados, 26,25–28,75 x 10,0–12,5 µm4. *M. mastoidea*

1. *Chlorophyllum molybdites* (Meyer: Fr.) Masee in Kew Bull. 1898: 136. 1898.

Basiônimo: *Agaricus molybdites* Meyer: Fr, Syst. Myc. 1, 308. 1821.

Mastocephalus molybdites (Meyer: Fr.) O. Kuntze, Rev. Gen. Pl. 2: 860. 1891.

Lepiota molybdites (Meyer: Fr.) Sacc., Syll. Fung. 5: 30, 1887.

Leucocoprinus molybdites (Meyer: Fr.) Pat. in Bull. Soc. Mycol. Fr. 29: 215. 1913

Macrolepiota molybdites (Meyer: Fr.) Moreno, Bañares & Heykoop, Mycotaxon 55: 467, 1995.

Sinônimos de acordo com Vellinga 2001.

Figura 2 a-c, 7

Pileo convexo quando jovem a aplanado, carnoso, branco com escamas detérses marrom-acinzentadas, centro bege claro, 7,5–19,0 cm de diâm. Lamelas livres, porém próximas do estipe, com lamélulas, brancas a princípio, tornando-se esverdeadas. Estipe cilíndrico, liso, com base levemente alargada, branco “sujo”, 10–15 × 1,1–1,7 cm, bulbo 2,5 cm. Anel superior bem desenvolvido, esverdeado na parte interna. Esporada verde. Basidiósporos ovóides, esverdeados, de parede espessada, poro de germinação truncado, bem evidente, sem capa hialina, não metacromático em azul de cresil, sem reação com Melzer, 10,0–11,25 × 7,5–8,75 μm (Q = 1,3). Basídios clavados, tetraesporados, com esteríngmas mais inflados, hialinos, de parede fina, bem abundantes. Pleurocistídios ausentes. Queilocistídios clavados, hialinos, de parede fina, abundantes, 15–30 × 9–14 μm. Contexto com hifas hialinas, de parede fina, septadas, sem ansas, 5,0–7,5 μm de diâm. Trama da lamela paralela, hialina, formada por hifas de parede fina, septadas, sem ansas, 5,0–7,5 μm de diâm. Superfície pilear himenodérmica, com elementos clavados, hialina, hifas septadas, de parede fina, sem ansas, 6,5–7,5 μm de diâm. Basidioma gregário, terrestre, em matéria em decomposição.

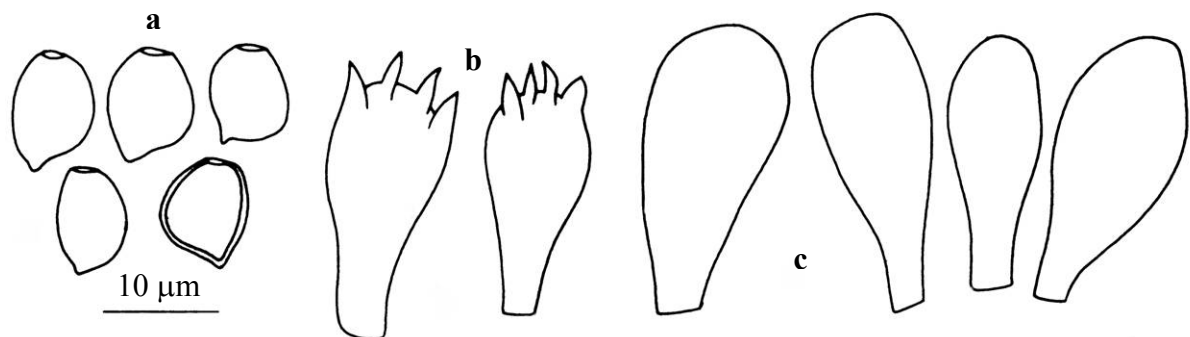


Figura 2. *Chlorophyllum molybdites* a. Basidiósporos. b. Basídios. c. Queilocistídios.

Material examinado: BRASIL: São Paulo: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, 23° 39'S e 46°37'W, 798 m, 02-XII-2003, Z.R.B. *Santana s.n.* (SP375868), 11-IV-2005, L.J. *Gimenes LJG 0120/05* (SP), 31-X-2005, L.J. *Gimenes LJG 0124/05* (SP).

Comentários: No Brasil, *C. molybdites* é mencionado para o Pernambuco (Pegler & Rayner 1969), Rio de Janeiro (Dennis 1952, Pegler & Rayner 1969) e São Paulo (Grandi *et al.* 1984, Pegler 1997). A distribuição mundial inclui Estados Unidos (Singer 1948, Dennis 1952, Pegler 1983), Argentina (Singer & Digilio 1952), Guiana Inglesa e Trinidad (Dennis 1952), África do Sul, Austrália, Canadá, Estados Unidos, Guiana Israel, Malásia, Quênia, Serra Leoa, Tanzânia e Trinidad (Pegler 1969, Vellinga 2003), Venezuela (Dennis 1970), Guadalupe, Guiana e Martinica (Pegler 1983), Holanda (Vellinga 2003) e China (GE & Yang 2006).

A cor verde das lamelas, dos basidiósporos e da esporada é uma característica marcante e de fácil reconhecimento da espécie. Por causa da sua vasta distribuição e de seus efeitos tóxicos, causando problemas gastro-intestinais, principalmente se ingerido cru, *C. molybdites*, é uma das espécies de fungos lepiotáceos mais mencionada na literatura (Vellinga 2001). O hábito do basidioma de *Chlorophyllum molybdites* é similar a *Macrolepiota*, sendo muitas vezes diferenciado pela ausência de ansas e pelos seus basidiósporos verdes (Pegler 1969).

Os basidiósporos dos materiais coletados no PEFI são um pouco maiores quanto ao tamanho que os citados por Pegler (1969, 1983) e Vellinga (2001), havendo também uma variação entre os materiais de Pegler (1983) e Vellinga (2001). As demais características, tanto macro quanto microscópicas, permitem determinar o material do PEFI como *Chlorophyllum molybdites*, que também foi confirmado com a análise molecular.

2. *Chlorophyllum pulchellum* (de Meijer & Vellinga) Gimenes & Capelari, comb.nov.

Basiônimo: *Lepiotella brunnea*, Rick in Lilloa 2: 251. 1938, non *Lepiotella* (E.J. Gilbert) Konrad, 1934, non *Macrolepiota brunnea* (Falow & Burt) Wasser, 1993.

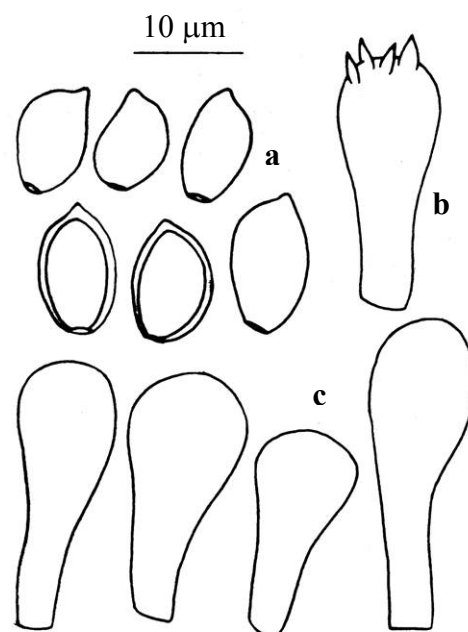
Volvolepiota brunnea (Rick) Singer, Bol. Soc. Arg. Bot. 8: 12. 1959.

Macrolepiota pulchella de Meyer & Vellinga, Mycotaxon 85: 183-186. 2003.

Sinônimos de acordo com Vellinga & Yang 2003.

Figura 3 a-c, 9-10

Pileo cônico, com umbo marcante, marrom-acinzentado, recoberto por escamas marrom-acinzentadas mais escuras, umbo escuro, escamas fasciculadas, sendo que as das margens se soltam com mais facilidade, 5,5 cm de diâm. Lamelas livres, brancas, distantes do estipe, muito próximas entre si, com lamélulas, margem lisa. Estipe cilíndrico, liso, retorcido, concolor com pileo, brilhante, base mais larga que o ápice, $17,5 \times 0,7-1,1$ cm (na base). Anel superior branco, com margem marrom-acinzentada na superfície inferior. Base do estipe com volva saculiforme branca. Esporada branca. Basidiósporos elípticos, hialinos, parede espessada, os esporos menores têm uma parede menos espessada do que os esporos maiores, com apículo, com poro de germinação, sem capa hialina, metacromáticos em azul de cresil, dextrinóides, $10,0-11,25 \times 6,25-7,5$ μm , ($Q=1,54$). Basídios clavados, hialinos, de parede fina, tetraesporados, com esterigmas muito curtos que dificultam a visualização. Pleurocistídios ausentes. Queilocistídios clavados, abundantes, hialinos, parede fina, $18,75-30,0 \times 7,5-10$ μm . Contexto hialino, formado por hifas hialinas, de parede fina, septadas, sem ansas. Trama da lamela paralela, hialina, hifas septadas, parede fina, sem ansas, $3,75-6,25$ μm de diâm. Superfície pilear himenodérmica, hialina com elementos clavados a globosos, hifas septadas, parede fina, sem ansas, $6,25-10,0$ μm de diâm. Basidioma terrestre, solitário.

Figura 3. *Chlorophyllum pulchellum*. a. Basidiósporos. b. Basídio. c. Queilocistídios.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, 23° 39'S e 46°37'W, 798 m, 09-X-2001, *U.C.Peixoto s.n.* (SP); 19-VII-2006, *L.J. Gimenes & F. Karstedt LJG 0130/06*, 03-VIII-2006, *C. Puccinelli CP193* (SP).

Comentários: no Brasil, *C. pulchellum* é conhecida para São Paulo (Bononi *et al.* 1981, como *Volvolepiota brunnea* (Rick) Singer) e Rio de Janeiro (Albuquerque 2006, como *Macrolepiota pulchella* de Meyer & Vellinga). A distribuição mundial abrange a Argentina (Singer 1986).

O gênero *Lepiotella* Rick é homônimo de *Lepiotella* (E.J. Gilbert) Konrad descrito em 1934. Singer (1953) examinou os espécimes de Rick de *L. brunnea* e simplesmente chamava-a de *Macrolepiota* volvada. Singer (1959) propôs o novo nome *Volvolepiota* para *Lepiotella* de Rick. Posteriormente, Heinemann & de Meijer (1996), concluíram que *Volvolepiota* não é fundamentalmente diferente de *Macrolepiota* somente pela presença de uma volva, porém conservaram *Volvolepiota* como um gênero separado. Estudos moleculares da região ITS têm mostrado que espécies com volva e véu remanescente no píleo formam um clado separado, mas este clado está situado dentro de *Macrolepiota* senso estrito ou na base do clado de *Macrolepiota*. A mais óbvia diferença morfológica entre *Volvolepiota* e *Macrolepiota* é a presença de volva. Os basidiósporos em *Volvolepiota* são relativamente pequenos quando comparados com os de *Macrolepiota*. Uma importante similaridade entre os dois gêneros é a superfície do píleo tricodérmica com elementos clavados, poro de germinação tem uma interrupção no episório e a superfície do estipe. As diferenças não justificam um gênero separado, e *Volvolepiota* é, portanto, considerado um sinônimo de *Macrolepiota* (Vellinga & Yang 2003).

Um novo nome foi proposto para *Volvolepiota brunnea*, passando para *Macrolepiota pulchella* de Meijer & Vellinga, a qual não pôde ser nomeada *Macrolepiota brunnea*, pois já havia esta espécie de (Farlow & Burt) Wasser, 1993.

Após as análises moleculares, constatou-se que *Macrolepiota pulchella*, na realidade, é uma espécie de *Chlorophyllum*, pois segregou com as demais do gênero *Chlorophyllum*. Foi necessário um reestudo morfológico, principalmente em relação à microscopia, e constatou-se que esta espécie

apresentava superfície pilear himnodérmica assim como as espécies de *Chlorophyllum*. Portanto, verificou-se que *M. pulchella* é uma espécie de *Chlorophyllum* sendo então, proposta uma combinação nova, *C. pulchellum* (de Meijer & Vellinga) Gimenes & Capelari, comb. nov.

3. *Macrolepiota bonaerensis* (Speg.) Singer, Lilloa 22: 417. 1951

Basiônimo: *Lepiota bonaerensis* Speg. Saccardo's Syll. Fung. V: 28, XII: 982; XIX: 1075. 1919

Sinônimo de acordo com Singer & Digilio 1952.

Figura 4 a-c

Pileo umbonado, branco, com escamas adpressas, mais escuras do que a superfície do píleo, 9,8 cm de diâmetro. Lamelas próximas. Esporada não observada. Basidiósporos elípticos, hialinos, parede espessada, com poro de germinação bem evidente, metacromáticos em azul de cresil, dextrinóides, $15,0-16,25 \times 8,75-10,0 \mu\text{m}$ ($Q=1,66$). Basídios, clavados, abundantes, tetraesporados, com parede fina. Pleurocistídios ausentes. Queilocistídios clavados, hialinos, parede fina, $28,75-37,5 \times 13,75-15,0 \mu\text{m}$. Contexto hialino, formado por hifas hialinas, septadas, de parede fina, ansas não observadas. Trama da lamela regular, hialina, hifas septadas, parede fina, ansas não observadas. Superfície pilear tricodérmica com elementos cilíndricos, parede espessada, $7,5-10,0 \mu\text{m}$ de diâm. Basidioma terrestre, solitário.

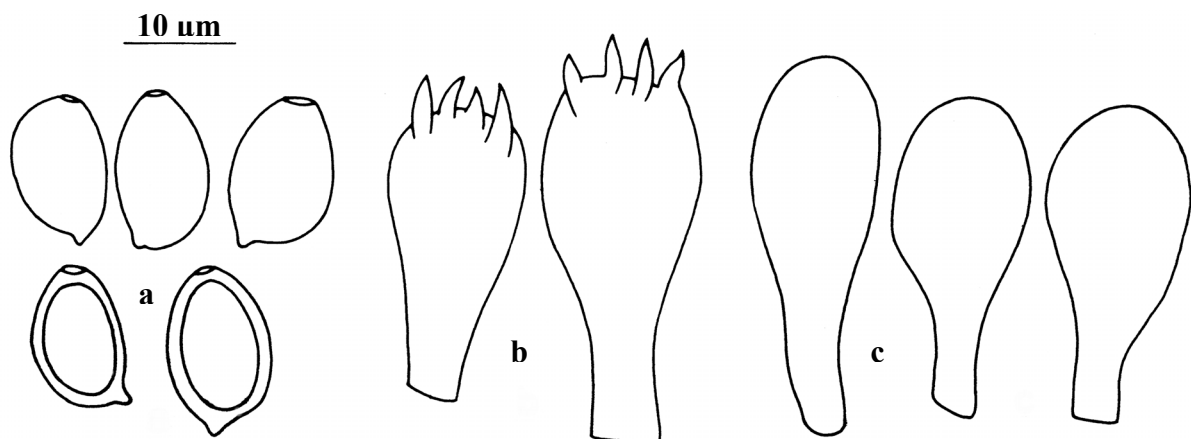


Figura 4. *Macrolepiota bonaerensis*. a. Basidiósporos. b. Basídios. c. Queilocistídios

Material examinado: BRASIL. São Paulo: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, 09-XII-1982, *B.A. Rocha s.n.* (SP177829), 12-XII-1986, *R. Maziero s.n.* (SP211704), 11-III-1992, *A.I. Milanez s.n.* (SP250391).

Comentários: as informações macroscópicas foram resgatadas da exsicata, quando possível, pois não havia anotações dos coletores com o material.

Há poucos registros de *M. bonaerensis* no mundo, sendo mencionada apenas por Singer & Digilio (1952) para a Argentina. No Brasil, são mencionadas apenas três coletas para São Paulo (PEFI). *M. bonaerensis* é uma espécie muito próxima da espécie européia *M. procera* (Singer & Digilio 1952) e também uma espécie comestível, mas não tão saborosa quanto *M. procera* (Singer & Digilio 1952).

Os basidiósporos dos materiais coletados no PEFI são um pouco menores em relação à largura que os mencionados por Singer & Digilio (1952), de 14,5–16 × 11,3–11,8 µm. As outras características dos basidiósporos, como presença de poro germinativo, amiloidia e metacromatismo concordam com o material dos autores citados, confirmando então, a identificação feita por Pegler nos três materiais citados.

4. *Macrolepiota mastoidea* (Fr.: Fr.) Singer in Lilloa 22: 417. (1949). 1951.

Basiônimo: *Agaricus mastoideus* Fr.: Fr., Syst. mycol. 1: 20. 1821.

Lepiota mastoideus Fr., Syst. Mycol. 1: 20. 1821.

L. umbonata [Schum.] Schroet. In Cöhn., Kryptog. Fl. Schles.: 675. 1889.

Lepitophyllum mastoideum (Fr.) Locq. in Bull. Soc. Linn. Lyon. 11: 40. 1942.

Leucocoprinus mastoideus (Fr.) Locq. in op. cit. 12: 95. 1945.

Sinônimos de acordo com Pegler 1977.

Figura 5 a-c

Pileo umbonado, com escamas fibrilosas, 9,2 cm de diâm. Lamelas próximas entre si, livres, remotas do estipe. Esporada não observada. Basidiósporos elípticos, parede espessada, hialinos, com poro de germinação com capa hialina, metacromáticos em azul de cresil, dextrinóides, $15-16,25 \times 8,75-10,0 \mu\text{m}$, ($Q=1,65$). Basídios tetraesporados, parede fina, hialinos, clavados, ansas basais não foram observadas, $37,5-40,0 \times 12,5-15,0 \mu\text{m}$. Pleurocistídios ausentes. Queilocistídios clavados, parede fina, hialinos, $26,25-28,75 \times 10-12,5 \mu\text{m}$. Contexto hialino, formado por hifas hialinas, de parede fina, septadas, ansas não observadas, $6,25-8,75 \mu\text{m}$ de diâm. Trama da lamela regular, hialina, com hifas de parede fina, hialinas, septadas, ansas não observadas, $5,0-7,5 \mu\text{m}$ de diâm. Superfície pilear tricodérmica com elementos cilíndricos, hifas hialinas, parede fina, sem ansas, $6,25-7,5 \mu\text{m}$ de diâm. Basidioma terrestre, solitário.

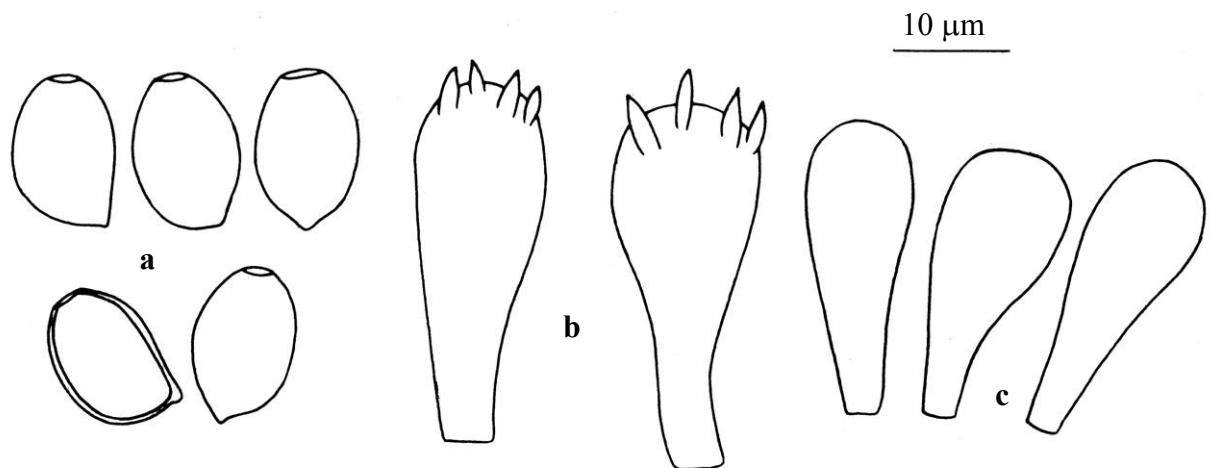


Figura 5. *Macrolepiota mastoidea*. a. Basidiósporos. b. Basídios. c. Queilocistídios.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, 798 m, 01-XII-1982, *B. A. Rocha* (SP177828).

Comentários: as informações macroscópicas foram resgatadas da exsicata, quando possível, pois não havia anotações dos coletores com o material.

No Brasil, *Macrolepiota mastoidea* foi registrada para o estado de São Paulo (Grandi *et al* 1984). A distribuição mundial abrange Europa (Heinemann 1969), Congo (Heinemann 1977), Quênia (Pegler 1977), Itália (Candusso & Lanzoni 1990) e Holanda (Vellinga 2001).

Os basidiósporos do material coletado no PEFI possuem dimensões próximas aos materiais examinados por Pegler (1977) com $11-15 \times 7,5-9 (-12) \times 8,5 \mu\text{m}$, por Candusso & Lanzoni (1990) com $(11-13-16,5(-19) \times (7,5-8-9,5(-10,5) \mu\text{m}$ e por Vellinga (2001) com $(11) 11,5-18,5(-20) \times 7,5-12 \mu\text{m}$. O material estudado concorda bem com as descrições de Pegler (1977), Candusso & Lanzoni (1990) e Vellinga (2001), exceto pelas dimensões dos queilocistídios, onde há uma pequena variação. As medidas citadas por Pegler (1977), Candusso & Lanzoni (1990) e Vellinga (2001) são respectivamente $25-40 \times 12-16 \mu\text{m}$, $20-40-(50) \times (6)-8-15 \mu\text{m}$ e $11-42 \times 6-16 \mu\text{m}$. Portanto, pode-se confirmar a determinação feita por G. Guzmán para o material identificado como *Macrolepiota mastoidea* (SP177828).

5. *Macrolepiota* sp.

Figura 6 a-c, 8

Píleo cônico quando jovem a aplanado quando maturo, de coloração marrom, retendo um umbô bem saliente marrom mais escuro, com escamas fibrilosas, com distribuição mais ou menos concêntrica em direção à margem, margem lisa, 8,0–8,6 cm. Estipe cilíndrico, levemente sinuoso na parte superior, base bulbosa, concolor ao píleo, fibriloso a escamoso com escamas revolutas, 18,0–24,7 × 1,0–2,0 cm. Anel superior bem desenvolvido branco com a margem marrom. Esporada branca. Basidiósporos elípticos, hialinos, de parede espessada, com poro de germinação truncado bem evidente, capa hialina, metacromáticos em azul de cresil, dextrinóides, 14,0–15,0 × 9,0–10,0 μm (Q = 1,5). Basídios clavados, tetraesporados, hialinos, abundantes, 27,5–44,0 × 11,5–17,5 μm. Pleurocistídios ausentes. Queilocistídios clavados, abundantes, hialinos, parede fina, 27,5–44,0 × 11,5–14,0 μm. Contexto com

hifas hialinas, de parede fina, septadas, sem ansas, 4,0-9,0 μm . Trama da lamela regular, com hifas hialinas, septadas, sem ansas, parede fina, 5,0-7,5 μm . Superfície pilear tricodérmica, com hifas hialinas, de parede fina, septadas, sem ansas, 5,0-7,5 μm . Basidioma solitário, terrestre, sobre folhas secas.

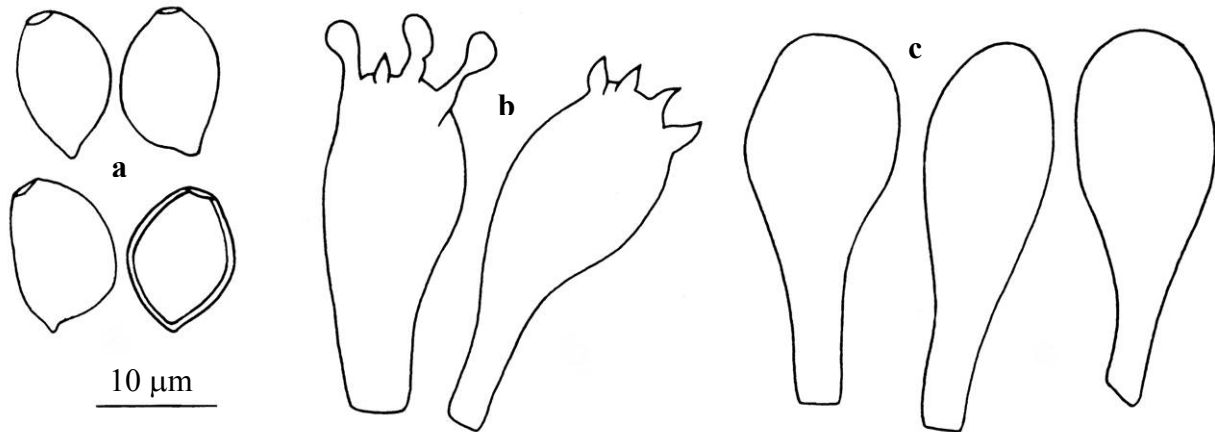


Figura 6. *Macrolepiota* sp. a. Basidiósporos. b. Basídios. c. Queilocistídios.

Material examinado: BRASIL. São Paulo: São Paulo, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, 09-X-2001, *U.C. Peixoto s.n.* (SP); 10-X-2001, *U.C. Peixoto s.n.* (SP); 26-XII-2001, *U.C. Peixoto s.n.* (SP); 11-XII-2003, *M.D.F. Trude LJG 022/03* (SP); 08-I-2004, *L.J. Gimenes & col. LJG 031/04* (SP), 21-III-2006, *F. Karstedt & M. Capelari FK 607* (SP).

Comentários: O exemplar foi enviado para Dra Else C. Vellinga para identificação, tendo sido por ela nomeado como *Lepiota procera* var. *vulpina* Rick, pertencente ao gênero *Macrolepiota*. A descrição fornecida por Rick para esta variedade é muito incompleta, não permitindo a identificação do material e também *Macrolepiota procera* é uma espécie de distribuição geográfica bastante delimitada, não ocorrendo em regiões tropicais (Vellinga 2004) e as escamas de *M. procera* são adpressas enquanto em *Macrolepiota* sp. são fibrilosas.

Analisando a descrição morfológica de outros materiais, a espécie mais próxima do material estudado foi *M. dolichaula* (Berk. & Br.) Pegler & Rayner. Pegler (1977) descreve *M. dolichaula* com basidioma de coloração canela a canela-rosada, minutas escamas concêntricas e esporos ovóides, medindo $10,5\text{--}14,5 \times 7\text{--}10$ ($12,5 \times 8,5$) μm e poro de germinação não conspícuo. No material do PEFI, as escamas são fibrilosas, os basidiósporos são elípticos, variando de $14\text{--}15 \times 9\text{--}10$ μm , com poro de germinação truncado e bem evidente.

Comparando com a sucinta descrição de *M. dolichaula* fornecida por Vellinga (2003), o material do PEFI difere na coloração do basidioma, os basidiósporos são ligeiramente menores que os citados $12,4\text{--}14,8 \times 8,6\text{--}9,4$ μm .

De acordo com as análises moleculares, o gene nLSU não foi gene muito informativo para *Macrolepiota* sp., devido a um baixo valor de “bootstrap” com *M. colombiana*, a qual também é originária de clima tropical. Se forem feitas análises filogenéticas com outros genes ou baseadas em caracteres morfológicos, esta questão poderá ser elucidada.

Esta espécie não concorda com as descrições de *Macrolepiota* existentes na literatura e será proposta como espécie nova para a ciência.



Figura 7-10: 7. *Chlorophyllum molybdites*, 8. *Macrolepiota* sp., 9. *C. pulchellum* , 10. Volva – *C. pulchellum*. Fotos: M. Capelari.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Maurício Bacci Junior, Ms Giovana Gonçalves Vinha e Marcelo de Lima Marchesin, da UNESP de Rio Claro, pela ajuda nas análises filogenéticas e a FAPESP pelo apoio financeiro (processo FAPESP 04/04319-2).

Literatura citada

- Albuquerque, M. P.** 2006. Fungos Agaricales em trechos de Mata Atlântica da Reserva Biológica do Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Bononi, V.L.R., Trufem, S.F.B., Grandi, R.A.P.** 1981. Fungos macroscópicos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil, depositados no Herbário do Instituto de Botânica. *Rickia* 9:37-53.
- Bicudo, D.C., Forti, M.C. & Bicudo, C.E.M.** 2002. Parque Estadual das Fontes do Ipiranga: unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, São Paulo.
- Candusso, M. & Lanzoni, G.** 1990. *Lepiota* s.l.- Fungi Europaei. Libreria Giovanna Biella, Saronno.
- Dennis, R.W.G.** 1952. *Lepiota* and allied genera in Trinidad, British West Indies. *Kew Bulletin* 7:459-499.
- Dennis, R.W.G.** 1961. Fungi Venezuelani: IV. Agaricales. *Kew Bulletin* 15:67-156.
- De Vuono, Y. S.** 1985. Fitossociologia do estrato arbóreo da floresta da Reserva Biológica do Instituto de Botânica (São Paulo, SP). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D.** 1996. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: Embrapa – Cenargen.
- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- GE, Z.W. & Yang, Z. L.** 2006. The genus *Chlorophyllum* (Basidiomycetes) in China. *Mycotaxon* 96: 181-191.
- Grandi, R.A.P., Guzmán, G. & Bononi, V.L.** 1984. Adições às Agaricales (Basidiomycetes) do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. *Rickia* 11:27-33.
- Heinemann, P.** 1969. Le Genre *Macrolepiota* Singer (Leucocoprineae) au Congo – Kinshasa. *Bulletin du Jardin Botanique Natational de Belgique* 39: 201-226.
- Heinemann, P.** 1977. *Leucocoprinus* (Agaricaceae) – Flore illustrée des champignons d' Afrique Centrale, v.5, pp 87-104.
- Heinemann, P. & de Meijer, A.A.R.** 1996. The status of *Volvolepiota* Sing. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 65: 405-412.
- Johnson, J.** 1999. Phylogenetic relationships within *Lepiota* sensu lato based on morphological and molecular data. *Mycologia* 91: 443-458.
- Johnson, J. & Vilgalys, R.** 1998. Phylogenetic systematics of *Lepiota* sensu lato based on nuclear large subunit rDNA evidence. *Mycologia* 90: 971-979.
- Kirk, P., Canon, P.F., David, J.C. & Stalpers, J.A.** 2001. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi.* CAB International, Wallingford.
- Moreno, G., Bañares, A. & Heykoop, M.** 1995. *Macrolepiota molybdites* (Meyer: Fr.) comb. nov., new to the Canary Islands. *Mycotaxon* 55: 467-471.
- Moncalvo, J.-M., Vilgalys, R., Redhead, S.A., Johnson, J.E., James, T.Y., Aime, M.C., Hofstetter, V., Verduin, S.J.W., Larsson, E., Baroni, T.J., Thorn, R.G., Jacobsson, S., Clémenco, H. & Miller Jr., O.K.** 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 357-400.

- Pegler, D.N.** 1969. Studies on African Agaricales II. Kew Bulletin 23: 219-249.
- Pegler, D.N.** 1971. A revision of the genus *Lepiota* from Ceylon. Kew Bulletin 27: 155-202.
- Pegler, D.N.** 1977. A preliminary Agaric Flora of East Africa. Kew Bulletin Additional Series 6:1-615.
- Pegler, D.N.** 1997. The agarics of São Paulo, Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Pegler, D.N. & Rayner, R.W.** 1969. A contribution to the Agaric Flora of Kenya. Kew Bulletin 23: 347-412.
- Rick, J.** 1907. Contributio ad monographiam Agaricearum et Polyporacearum brasiliensium. Broteria 6:65-92.
- Singer, R.** 1948. New and interesting species of Basidiomycetes II. Papers of the Michigan Academy of Science, Arts and Letters 32: 103-150.
- Singer, R.** 1953. Type studies on Basidiomycetes IV. Lilloa 26: 57-159.
- Singer, R.** 1959. Dos generos de hongos nuevos para Argentina. Boletin de la Sociedad Argentina de Botanica 8: 9-13.
- Singer, R.** 1986. The Agaricales in modern taxonomy. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Singer, R. & Digilio, A.P.L.** 1952. Pródromo de la Flora Agaricina Argentina. Lilloa 25: 5-461.
- Swofford, D.L.** 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22: 4673-4680.
- Vellinga, E.C.** 2001. *Leucocoprinus* Pat. In Flora Agaricina Neerlandica: critical monographs on families of agarics and boleti occurring in the Netherlands (M.E. Noordeloos, T.W. Kuyper & E.C. Vellinga, eds.), A.A.Balkema Publishers, Lisse, v.5, pp 76-84.
- Vellinga, E. C.** 2002. New combinations in *Chlorophyllum*. Mycotaxon 83: 415-417.

- Vellinga, E.C.** 2004. Genera in the family Agaricaceae: evidence from nrITS and nrLSU sequences. *Mycological Research* 108: 354-377.
- Vellinga, E.C. & Yang, Z.L.** 2003. *Volvolepiota* and *Macrolepiota*- *Macrolepiota velosa*, a new species from China. *Mycotaxon* 85: 183-186.
- Vellinga, E. C., de Kok, R. P. J. & Bruns, T. D.** 2003. Phylogeny and taxonomy of *Macrolepiota* (Agaricaceae). *Mycologia* 95: 442-456.

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho possibilitou ampliar o conhecimento das espécies da tribo Leucocoprineae no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI). Foram analisadas 45 exsicatas coletadas pela autora, por outros coletores e também revisadas as exsicatas depositadas no Herbário SP. Deste número, foi possível reconhecer sete espécies pertencentes ao gênero *Leucocoprinus*, duas do gênero *Chlorophyllum* e três do gênero *Macrolepiota*, totalizando 12 espécies estudadas.

Leucocoprinus cepistipes (Sow.: Fr.) Pat. sensu Candusso & Lanzoni, constitui primeira citação para o PEFI e para o estado de São Paulo.

Leucocoprinus sp. será proposta como espécie nova para a ciência.

Chlorophyllum pulchellum (de Meijer & Vellinga) Gimenes & Capelari, comb. nov., a partir dos estudos taxonômicos complementados com moleculares, é proposta como combinação nova.

Macrolepiota sp. também será proposta como espécie nova para a ciência.

Em relação aos estudos moleculares, verificou-se que o gene nLSU rDNA não foi um marcador eficiente para a tribo Leucocoprineae, com exceção do gênero *Chlorophyllum*. As seqüências foram muito semelhantes, acarretando várias politomias, as quais são resultantes de uma região muito conservada e pouco informativa. Como sugestão para melhorar os resultados moleculares, o gene ITS será amplificado para posterior seqüenciamento e análise filogenética desta região.

Além disso, é sabido que para o sucesso na extração de DNA, é necessária a secagem dos materiais em temperaturas de até 40 °C e que acima desta temperatura, ocorre a degradação do DNA (Herrmann & Hummel 1994). Muitos dos nossos materiais encontravam-se nestas condições o que dificultou em algumas espécies e impossibilitou a extração de DNA de *Macrolepiota bonaerensis* e *M. mastoidea*, que estavam depositadas no Herbário SP.

Como resultado positivo, tivemos um grande avanço nos estudos moleculares, desde a escolha do protocolo de extração até a finalização das análises filogenéticas, já que no Brasil, este trabalho é pioneiro de taxonomia complementada por estudos moleculares em Agaricaceae.

Literatura citada:

Herrmann, B. & Hummel, S. 1994. Ancient DNA: Recovery and Analyses of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens. Springer-Verlag. 263 p.