

ANA CRISTINA BOLAÑOS ROJAS

DIVERSIDADE DO GÊNERO *GANODERMA*
Karst. (Ganodermataceae) E ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DE ESPÉCIES QUE
OCORREM EM LEGUMINOSAS NO
BRASIL E NA COLÔMBIA

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR EM BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2016

ANA CRISTINA BOLAÑOS ROJAS

DIVERSIDADE DO GÊNERO *GANODERMA*
Karst. (Ganodermataceae) E ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DE ESPÉCIES QUE
OCORREM EM LEGUMINOSAS NO
BRASIL E NA COLÔMBIA

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR EM BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Vera Lucia Ramos Bononi

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Jaime Eduardo Muñoz
(Universidad Nacional de Colômbia)**

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Bolños Rojas, Ana Cristina

B687d Diversidade do gênero *Ganoderma* Karst. (Ganodermataceae) e atividade enzimática de espécies que ocorrem em leguminosas no Brasil e na Colômbia / Ana Cristina Bolños Rojas -- São Paulo, 2016.
145p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2016.
Bibliografia.

1. Ganodermataceae. 2. Biologia molecular. 3. Neotrópico. I. Título.

CDU: 582.28

Ao meu filho Gabriel Felipe e meu esposo Gabriel com todo meu amor!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Vera Lúcia Ramos Bononi, por encontrá-la novamente no meu caminho após vários anos e aceitar me orientar no Doutorado, pela dedicação incondicional em todo momento, seus sábios e valiosos ensinamentos, sua amizade, paciência, confiança e principalmente por ser essa pessoa de luz que sempre me apoiou e deu força para ir em frente.

Ao Dr. Jaime Eduardo Muñoz da Universidad Nacional de Colômbia, sede Palmira, por orientar, passar grandes ensinamentos em Biologia Molecular, colocar o laboratório de Biologia Molecular a minha disposição para realizar diferentes aspectos moleculares deste trabalho, e por ser a grande pessoa que sempre está disposta a auxiliar.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, pela oportunidade para continuar a minha formação acadêmica.

À Universidad del Valle em Cali-Colômbia, por me conceder o tempo e o suporte financeiro para viabilizar a minha estada durante o tempo no Brasil.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pelo suporte financeiro ao projeto (Processo No. 2012/16809-0).

À Prefeitura de São Paulo, e especialmente a Lucí Okino pela colaboração e por facilitar a coleta dos espécimes de *Ganoderma* presentes em algumas árvores da cidade de São Paulo.

Às Dras. Adriana de Mello Gugliotta e Vera Maria Vitali pelas recomendações e discussões técnicas que enriqueceram a minha pesquisa, apoio e conselhos que sempre foram oportunos.

À Dra. Carmen Lidia Zottarelli por facilitar o uso do laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisa em Micologia, para completar algumas fases da pesquisa.

Ao meu filho e meu esposo pela dedicação, suporte, motivação, paciência, espera e por apoiar sempre o sonho de concluir o meu Doutorado.

Ao meu pai (In memoriam) e minha mãe pelo apoio absoluto para concretizar os meus sonhos, pelo amor, carinho, por tudo. Especialmente ao meu pai pelo otimismo, tenacidade e por ensinar que a aprendizagem do ser humano nunca termina.

A todos os meus irmãos, especialmente a minha irmã Maria Lyda pelo apoio incondicional, companhia presente de todos os dias, conselhos e percepções, apesar dos

592 km de distância. Ao meu irmão Alberto por estar sempre disponível para me ajudar principalmente em assuntos relacionados ao meu local de trabalho.

A todo o Pessoal do Núcleo de Pesquisa em Micologia e pelo suporte técnico, amizade e apoio em todo momento.

Ao pessoal de apoio do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica pela ajuda técnica.

Ao Alex Mora pelo auxílio na aplicação de programas filogenéticos computacionais necessários à elaboração desta pesquisa.

Ao Alex Almeida pelo compromisso e dedicação na realização das análises espectrofotométricas.

A Robert T. González e Myriam Monsalve pela colaboração e ajuda com a coleta de espécimes de *Ganoderma* na Colômbia.

À Leila Díaz, Elkin Suárez e Isabella Suárez pela amizade e apoio incondicional. Ao Elkin pelo suporte na análise filogenética dos dados e as interessantes visões evolutivas.

Aos colegas do laboratório de Micologia do Instituto de Botânica, Nara Ballaminut, Lucí Okino, Sarah Cristina Oliveira, Ricardo Pires, Larissa Moro, Ana Lúcia de Jesus, Marcela Boro, Gustavo Gerônimo, Danilo, Viviana Motato e Mauro Westphalen pela amizade, conselhos, apoio técnico, científico e dicas em cada fase vivida. À Viviana Motato, Mauro Westphalen, Thiago Viera, Priscila Almeida, Aluizio Fernández, Ana Margarita Loaiza e Lucineide María Santana que, além do mais, foram companheiros de moradia e de gratos momentos e experiências compartilhadas.

Aos colegas Jorge Mario Londoño, Paula Rugeles, Julián Naranjo, Yamilet Gómez, Laura Serna, Ruben Rojas, Angélica Buitrago, Brigitte Tosse e Esperanza Obando, Guillermo Barreto do laboratório de Biologia Molecular, da Universidad Nacional e da Universidad del Valle, pela amizade, dicas e sugestões científicas.

A todos os professores das diferentes fases de minha educação, que com seus conhecimentos e experiências contribuíram para a minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta etapa.

RESUMO

Espécies do gênero *Ganoderma* Karst. (Polyporales) têm distribuição cosmopolita. Para a região tropical americana há registro de 22 espécies. *Ganoderma* ocorre em coníferas e angiospermas, onde comportam-se como saprófitas ou como parasitas. Em árvores leguminosas de arborização urbana espécies de *Ganoderma* são fitopatogênicas e provocam a morte de seu hospedeiro e a queda sobre veículos e pessoas. Visando contribuir para a taxonomia do gênero *Ganoderma* e obter informações preliminares que subsidiem futuro controle de doença em leguminosas utilizadas em arborização urbana foi realizado este trabalho. Neste estudo coletas foram realizadas nas cidades de São Paulo e Uberlândia no Brasil e Cali e Palmira na Colômbia e as espécies do gênero *Ganoderma* de ocorrência na família leguminosa foram identificadas utilizando a morfologia dos basidiomas, microestruturas, ultraestrutura de basidiósporos, biologia molecular e perfil enzimático. Em árvores leguminosas da arborização urbana na cidade de São Paulo, como parasitas, ocorre a espécie não lacada *G. gibbosum* (mais freqüente), não citada anteriormente para o Brasil, e as espécies lacadas *G. multiplicatum* e *G. subamboinense*, já citadas anteriormente para o Brasil. Para Uberlândia foi encontrado *G. Gibbosum*. Em Cali, na Colômbia, foram encontradas as espécies *G. gibbosum*, *G. multiplicatum*, uma espécie indeterminada e o complexo de espécies *G. parvulum*, sendo as espécies deste complexo as mais frequentes. *G. multiplicatum* é citada pela primeira vez para a Colômbia. Em áreas protegidas, sobre troncos mortos, no Parque Estadual da Cantareira (São Paulo, SP) foram encontradas *G. gibbosum* e *G. australe* e no Parque Estadual das Fontes de Ipiranga (São Paulo, SP) *G. australe* e *G. multiplicatum*, já citado para Parque e para vários locais do Brasil. A ultraestrutura do basidiósporo das espécies revelou quatro padrões de ornamentação da parede. A produção de enzimas ligninolíticas foi avaliada em treze linhagens, em dois meios de cultura 1) serragem + água e 2) serragem + ME (extrato de malte). Linhagens saprófitas e parasitas apresentaram atividade enzimática ligninolítica de fenoloxidasas e lacases, com predomínio de lacase nos dois meios de cultura testados. As linhagens parasitas apresentaram maior atividade enzimática no substrato serragem acrescida de extrato de malte. Produção de manganês peroxidase (MnP) só foi constatado para uma linhagem do complexo *G. parvulum*, mas análise molecular mostrou que os indivíduos testados possuem o gene da MnP. Há diferenças entre espécimes parasitas e sapróbias quanto a velocidade de crescimento em meio de cultura e atividade enzimática. As espécies saprófitas crescem mais lentamente e apresentam menor atividade de fenoloxidasas e lacases. Lignina peroxidase não foi detectada. Cento e vinte e nove sequências de espécies de *Ganoderma* do neotrópico produzidas neste trabalho foram incluídas na base de dados do GenBank e treze sequências do gene de Manganês peroxidase constituem as primeiras referências.

Palavras-Chave: Biologia Molecular, Polyporales, Ultraestrutura do basidiósporo, lacase, manganês peroxidase, Leguminosae, Neotrópico.

ABSTRACT

Species of the *Ganoderma* Karst. (Polyporales) have cosmopolitan distribution. 22 species have been already recorded for the American tropics. *Ganoderma* species occurs in conifers and in hardwoods of angiosperms, where they can behave as saprophytes or parasites. In leguminous trees in urban arborization species of *Ganoderma* are phytopathogenic and they may kill their hosts and fall on vehicles and people. *Ganoderma* species were collected in the cities of São Paulo and Uberlândia in Brazil and Cali and Palmira in Colombia. To contribute to the *Ganoderma* taxonomy and to obtain preliminary data to future disease control in leguminosae from urban areas this study was performed. In this study, the species of the genus *Ganoderma* that commonly occur in the legume family were identified by using the morphology of the basidiome, microstructures and ultrastructure of basidiospores, molecular biology, enzymatic profile, thus providing subsidies to taxonomy and future control. In leguminous trees in urban arborization in São Paulo, as parasite, the non-lacquered species *G. gibbosum* is the most frequent and it has not been cited in Brazil earlier; lacquered species, *G. multiplicatum* and *G. subamboinense* have already been cited in Brazil. In Cali, Colombia, species *G. gibbosum*, *G. multiplicatum* have been found, an undetermined species, and *G. parvulum* complex species, which are the most frequent. *G. multiplicatum* has been cited for the first time in Colombia. In protected areas such as Parque Estadual da Cantareira (São Paulo, SP) *G. gibbosum* and *G. australe* have been found on fallen logs, and in Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, SP) *G. australe* and *G. multiplicatum* have been found and they have already been cited in that park and in several sites in Brazil. The ultrastructure of the basidiospore wall has shown four ornamentation patterns. Related to the production of ligninolytic enzymes, out of the twelve strains evaluated in two culture media: A) sawdust+ water and B) sawdust+ ME (malt extract), only ten grew up. Saprophyte and parasite strains showed ligninolytic enzymatic activity of phenoloxidases and laccases, with predominance of laccase in the two culture media tried. The parasite strains presented higher enzymatic activity at the substrate sawdust moistened with malt extract. MnP production was only confirmed for a strain from the complex *G. parvulum*, but molecular analysis showed that the individuals tested have the MnP gene. There are differences between parasite species and saprobes concerning the growth rate in the culture media, being slower when the fungus grows in dead trees. There are also differences among enzymatic activities (less quantity of phenoloxidases and laccases when the fungus grows in dead trees). Lignin peroxidase was not detected. One hundred and twenty nine sequences of *Ganoderma* species from the Neotropics were produced and included in the database GenBank, and thirteen sequences of manganese peroxidase gene were deposited for the first time in this database.

Key words: Molecular biology, Polyporales, ultrastructure from the basidiospores, laccase, manganês peroxidase, leguminous, Neotropics.

LISTA DE SIGLAS

AFLPS = Polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados

ATP6 = ATP sintase

BCR = Podridão basal da raiz

BDA = Batata dextrose ágar

CAS = Cromoazurol S

CC = Cidade de Cali

CEL = Celulase

CBMI = Celulose cristalina

CCIBT = Colecao de cultura do instituto de Botânica de São Paulo

CMC = Carboxi metil Celulose

CTRA= Parque Estadual da Cantareira

CUVC = Herbário Universidad del Valle

ERP = Ecoparque Rio Pance

FAPESP = Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

Gapdh = Gliceraldeido 3-fosfato deidrogenase

GH = Glicosidase Hidrolase

IBT = Instituto de Botânica de São Paulo

IGR = Região intergênica

ITS 1, 2= Região espaçadora do ADN ribossomal

KDa = Kilodaltons

KEW = Herbário do Royal Kew Garden

5.8 S = Gene 5.8 S

LAC = Lacase peroxidase

LiP = Lignina peroxidase

LME = Enzimas modificadoras da lignina

LSU (25-28S) = Subunidade longa do ADN ribossomal nuclear

MCMC = Inferencia Bayesiana

ME = Extrato de malte = EM

MEA = Extrato de malte ágar

ML = Máxima verosimilhança = Máxima likelihood

MnP = Manganês peroxidase

MP = Máxima parsimonia

Mn-SOD = Gene do manganês peróxido dismutase

PEC = Parque Estadual da Cantareira

PEFI = Parque Estadual das Fontes do Ipiranga

PCR = Reação em cadeia da polimerase

PER = Peroxidase

PESM = Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia

PODs = Peroxidases ligninolíticas Classe II

RBBR = Rhemazol Brilliant Blue

RPB1 = RNA polimerase 1

RPB2 = RNA polimerase 2

SAS = Statistical Analysis Software

SP = Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo

SPC = Cidade de São Paulo

SSU (12 -18S) = Subunidade pequena do ADN ribossomal

Tef 1 = Fator de alongamento 1 α

UB = Cidade de Ubêrlândia

VP = Peroxidase versatil

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A família Ganodermataceae	1
1.2. O gênero <i>Ganoderma</i>	2
1.3. Aspectos biológicos do gênero <i>Ganoderma</i>	3
1.4. Consideração taxonômica atual do gênero <i>Ganoderma</i>	10
1.5. <i>Ganoderma</i> no Neotrópico	11
1.6. Aspectos ecológicos do gênero <i>Ganoderma</i>	13
1.7. Importância medicinal-econômica	18
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Áreas de coleta	21
3.2 Coleta de material.....	24
3.3. Identificação morfológica	25
3. 4. Análise da ultraestrutura da parede dos basidiósporos.....	25
3.5. Identificação das plantas	26
3.6. Isolamento em meio de cultura e conservação.....	26
3.7. Análise de culturas isoladas	26
3.8. Teste enzimático qualitativo.....	27
3.9. Estudo molecular.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Espécies de <i>Ganoderma</i> , locais de coleta, hospedeiros em áreas protegidas e urbanas	33
4.2. Culturas obtidas e características macroscópicas e microscópicas das culturas isoladas.....	36
4. 3. Análise de crescimento em extrato de malte (MEA)	41
4.4. Análise qualitativa de enzimas.....	42
4.5 Análise molecular.....	49
CAPÍTULO 1. Diversity of <i>Ganoderma</i> species occurring in leguminous plants and dead trees in two regions of the Neotropics, a phylogenetic and morphological approach.....	53
CAPÍTULO 2. New records of <i>Ganoderma multiplicatum</i> (Mont.) Pat. from Colombia and geographic distribution in South America	84

CAPÍTULO 3. Ligninolytic enzymes activity in saprophyte and parasite species of <i>Ganoderma</i>	93
CAPÍTULO 4. Detecting Manganese Peroxidase (MnP) gene in <i>Ganoderma</i> species	113
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
6. LITERATURA CITADA	126

1. INTRODUÇÃO

1.1. A família *Ganodermataceae*

Ganodermataceae é uma família derivada de Polyporaceae *sensu* Fries que inclui fungos com himenóforo poroide e basidiósporo peculiar caracterizado por apresentar uma parede dupla, formada por uma interna verrucosa a ornamentada, espessada e usualmente colorida e parede externa fina e hialina (Ryvarden 2004; Cannon & Kirk 2007). O tipo de ornamentação do esporo tem sido a característica mais relevante para a separação genérica (Ryvarden 1991). Donk em 1948 usou caracteres anatomicos e bioquímicos criando três famílias naturais, Bondarzewiaceae, Ganodermataceae e Hymenochaetaceae, para agrupar espécies poroides de acordo com a cor do basidioma e morfologia do basidiósporo. Estas famílias e outras segregadas por Donk foram bem aceitas e apresentam caracteres distintivos (Hibbett & Donoghue 1995).

Ganodermataceae compreende os gêneros *Amauroderma*, *Ganoderma*, *Haddowia* e *Humphreya* (Ryvarden 1991, Zhao & Zhang 2000, Kirk *et al.* 2008).

As abordagens moleculares iniciadas nos anos 90 para o tratamento taxonômico dos fungos (Hibbett *et al.* 2007) propõem um sistema de classificação filogenético que coloca o gênero *Ganoderma* dentro da ordem Polyporales da classe Agaricomycetes.

A filogenia para Polyporales obtida por análise do DNA ribossomal, dos genes codificadores de proteínas rpb1, rpb2, tef1 e do genoma completo sugerem que Polyporales está formado por quatro clados. Três bem suportados conhecidos como clado antrodia, clado núcleo poliporóide e clado phlebioide e um denominado clado residual polyporóide pouco suportado. *Ganoderma* está incluso no clado núcleo poliporóide (Binder *et al.* 2005, Justo & Hibbett 2011, Miettinen *et al.* 2011, Sjakvist *et al.* 2012, Binder *et al.* 2013).

1.2. O gênero *Ganoderma*

1.2.1. Histórico

O gênero *Ganoderma* Karst. foi criado por P. Karsten em 1881, para reconhecer um fungo lacado e estipitado, *Polyporus lucidus* W. Curtis: Fr., espécie tipo do gênero *Ganoderma*, originalmente coletado em Peckham, área localizada ao sul de Londres. Steyaert (1961) designou a prancha No 224 da Flora Londrinense de Curtis como o tipo da espécie, em conformidade com o artigo 10 do Código Internacional de Nomenclatura Botânica adotada pelo 8º Congresso Internacional de Botânica em Paris, julho de 1954. O material tipo está perdido (Richter *et al.* 2015).

Quanto à taxonomia do grupo, vários conceitos genéricos foram desenvolvidos por diferentes autores a partir de caracteres principalmente morfológicos. Desse modo Patouillard (1889), baseando-se na parede dupla do basidiósporo, descreveu e reconheceu 48 espécies para o gênero e criou *Amauroderma* para as espécies com esporos esféricos a subesféricos com parede uniformemente espessada. No mesmo ano, Karsten (1889) criou o gênero *Elfwingia* baseado em *Boletus applanatus* Persoon, para separar as espécies não lacadas de *Ganoderma*. Murrill (1902, 1920) reconheceu os gêneros *Ganoderma* e *Elfwingia*, emendou *Amauroderma* e criou *Tomophagus* para incluir *Polyporus colossus* Fr. (Murrill 1905) o qual posteriormente foi considerado sinônimo de *Ganoderma* por Furtado (1965), Steyaert (1972) e Ryvarden (1991). O conhecimento dos gêneros *Ganoderma* e *Amauroderma* foi documentado no Neotrópico e na América do Sul por Donk (1933) e Furtado (1965). Na Ásia Imazeki (1939), propôs *Elfwingia* P. Karst. como subgênero de *Ganoderma* e em 1952 elevou a nível genérico *Trachyderma* Imaz. para acomodar *G. tsunodae* (Yasuda) Trott. Steyaert (1972) propôs três novos gêneros, *Haddowia*, *Humphreya* e *Magoderma*. Zhao *et al.* (1989) segregaram o subgênero *Ganoderma* de acordo com a cor do contexto (Moncalvo & Ryvarden 1997).

Ao longo da história, diversas abordagens tanto microscópicas, de estudos culturais, bioquímicos, ecológicos, genéticos, moleculares e evolutivos estão ajudando a compreender diferentes aspectos do grupo, mas há muitos problemas ainda.

1.3. Aspectos biológicos do gênero *Ganoderma*

1.3.1. Macromorfologia

Macromorfologicamente *Ganoderma* apresenta basidioma anual a perene, cuja forma pode ser dimidiada, circular, reniforme, flabelada, unguçada, imbricada ou convexa a aplanada. A superfície desse basidioma possui cutícula grossa, opaca ou lacada (Ryvarden 2004). Quanto à união ao substrato as espécies de *Ganoderma* podem apresentar estipe ou não (sésseis). Experimentos “*in vitro*” têm demonstrado que o desenvolvimento do estipe, seu tamanho e a inserção do estipe ao substrato, podem ser controlados pela duração e intensidade de exposição à luz e à concentração de dióxido de carbono, portanto depende das condições ambientais e não devem ser consideradas para circunscrever o gênero (Hseu 1990, Moncalvo 2000). Por outro lado, o desenvolvimento do estipe também depende da localização no hospedeiro, sendo mais provável que a partir da raiz de uma árvore se desenvolva um basidioma com estipe, do que um basidioma formado na parte alta do caule um sem estipe (Chenn 1993).

O basidioma possui contexto de consistência firme e fibrosa, homogêneo quanto a coloração ou com variação de castanho-claro a castanho-púrpura-escuro. Em geral, o contexto é mais claro na superfície e mais escuro no centro. O contexto pode apresentar também incrustações ou linhas resinosas contínuas ou não (Torres-Torres *et al.* 2012).

1.3.2. Micromorfologia

O gênero *Ganoderma* está bem circunscrito pelo basidiósporo truncado, elipsóide, com poro germinal apical, parede ornamentada, dupla: a externa (exospório) fina e hialina e a interna (endospório) de cor castanha-escuro, separada por cristas internas (Ryvarden 2004).

As espécies de *Ganoderma* são formadas por vários tipos de hifas: generativas, esqueléticas e conectivas (Furtado 1962, Steyaert 1980, Corner 1983). Haddow (1931) observou pileocistídios pela primeira vez, e os usou para separar espécies. Posteriormente Furtado (1962), Teixeira (1962a, b) e Steyaert (1961, 1967, 1980), confirmaram a importância dos diferentes tipos de pileocistídios para a separação de espécies. Lohwag (1941) observou que as espécies do complexo *G. lucidum* tinham pileocistídios com terminações infladas, apresentando então uma derme tipo himenoderme, enquanto que as espécies do complexo *G. applanatum–australe* tinham pileocistídios parecidos a uma hifa ou seja uma derme tipo trichoderme. Segundo Steyaert (1980), trichoderme corresponde a characoderme.

A presença de clamidósporos é uma característica importante para a identificação de espécies, corroborado também por estudos filogenéticos moleculares. Apenas algumas poucas espécies de *Ganoderma*, como *G. colossum*, *G. subamboinense* e *G. weberianum*, formam clamidósporos no basidioma (Hong & Jung 2004, Douanla-Meli & Langer 2009).

Na opinião de Moncalvo (2000), a grande proliferação de nomes (espécies de *Ganoderma*) se deve a várias espécies diferenciadas a partir de caracteres pleomórficos, dependentes das condições ambientais e estágio de desenvolvimento. Basidiomas jovens em ativo crescimento em geral apresentam cores mais claras e brilhantes na superfície do que espécimes com vários dias ou semanas que tenham sido expostos a repetidos períodos de chuva ou seca, cobertos com pó, atacados por insetos ou colonizados por algas.

Quanto ao tamanho dos basidiósporos, considerado um dos caracteres mais discriminantes, também existem divergências entre os taxonomistas uma vez que em espécies como *G. tornatum*, o tamanho varia com a latitude e altitude onde são encontradas. O mesmo ocorre com outros caracteres como a cor do contexto. *G. lucidum* apresenta contexto mais escuro em linhagens coletadas em latitudes mais ao sul do continente europeu (Steyaert 1972).

Portanto, os caracteres macro e micromorfológicos são insuficientes para identificar espécies de *Ganoderma* (Ryvarden 1995).

1.3.3. Estudos de ultraestrutura

O valor dado às características morfológicas peculiares dos esporos de *Ganoderma*, especialmente a ornamentação da parede, foi um caráter utilizado inicialmente por Patouillard (1889) para separar as espécies do gênero.

Atkinson (1908) através da microscopia ótica, estudou a superfície externa da parede do esporo de várias espécies e concluiu que a parede era lisa e não equinulada ou verrucosa como se acreditava. O autor observou também que a parede externa hialina era perfurada por equínulas curtas, rugosas e finas, que se projetava do endospório até a superfície externa do exospório. Verificou-se então que a camada hialina é menos firme em consistência do que a camada pigmentada (endospório) e que quando o esporo seca esta camada colapsa, e a ornamentação aparece em esporos vistos de perfil (Pegler & Joung 1973).

Heim (1962) e Steyaert (1967b) baseados na ornamentação da parede, propuseram a existência de quatro tipos de parede: verrugosa ou equinulada simples; com equínulas grosseiras unidas por pontes finas; reticulada irregular e totalmente reticulada, hexagonal regular.

Pegler & Joung (1973) estudaram a parede de quatro espécies britânicas de *Ganoderma* com microscopia de varredura e ótica e observaram que quase todas pareciam ter uma parede equinulada simples, sendo que as equínulas eram finas em *G. resinaceum* e *G. applanatum* e moderadamente espessadas em *G. pfeifferi* e *G. valesiacum*. Através de microscopia de varredura estes mesmos autores foram os primeiros em observar esporos com cavidades longitudinais em *G. adpersum* e *G. applanatum*.

Basidiósporos com cavidades longitudinais foram observados também em coleções identificadas como *G. applanatum*, *G. formosanum* e *G. neojaponicum* de Taiwan (Hseu

1990, Yeh 1999), em *G. australe* da Nova Zelândia (Buchanan & Wilkie 1999), em *G. lobatum* da Argentina (Gottlieb *et al.* 1999b).

A ultraestrutura de espécies do complexo *G. lucidum* revelou que uma membrana perisporial contínua cobre todo o esporo, à exceção das aberturas circulares que se distribuem ao acaso variando em diâmetro em *G. lucidum* (0.2-0.6µm), *G. valesiacum* (0.3-0.9µm) e *G. pfeifferi* (0.1-0.4µm) e em número (Pegler & Joung 1973).

Adaskave & Gilbertson (1988), analisaram a parede do basidiósporo de várias espécies de *Ganoderma* por microscopia de varredura e observaram que todas as espécies estudadas tinham aberturas, mas em algumas espécies estas eram mais pronunciadas. Basidiósporos de *G. tsugae* apresentaram mais aberturas e as depressões da superfície foram mais pronunciadas enquanto os esporos de *G. colossum* apresentaram aberturas e depressões menos pronunciadas, e os esporos de *G. meredithae* apresentaram depressões circulares mais amplas.

Segundo Ryvar den (1991), devido à alta complexidade microanatômica do esporo e o basidioma de sésil a estipitado, este gênero pode ser considerado relativamente jovem, em processo de evolução e, portanto, ainda não sofreu uma forte especiação. Através de estudos moleculares um baixo nível de divergência nucleotídica da subunidade ribossomal longa (LSU) foi observado e deu suporte às inferências morfológicas (Moncalvo *et al.* 1995a).

Este gênero provavelmente é um dos grupos de fungos poliporóides mais confusos taxonomicamente; havendo mais de 250 combinações nomenclaturais publicadas (Moncalvo *et al.* 1995a). A falta de uma boa delimitação das espécies ocorre por várias razões, entre as quais citam-se: espécies descritas de uma ou poucas coleções; de uma única localidade; sinonímia controversa e inexistência de muitos tipos; vários nomes são ilegítimos ou caíram em desuso e algumas citações não consideram as regras de prioridade (Moncalvo & Ryvar den 1997).

1.3.4. Estudos culturais, intercompatibilidade e isoenzimas

A caracterização morfológica do micélio foi outra ferramenta utilizada visando a identidade das espécies. Nobles (1948, 1958) elaborou uma chave de múltipla escolha para 11 caracteres diagnósticos (presença ou ausência de oxidasas extracelulares, tipo de septação da hifa, ocorrência de estruturas especiais ou acessórias nos esporos, cor de hifa e micélio de entrecruzamento, mudanças de cor em meio de ágar, taxa de crescimento, formação dos basidiomas, odor, relação com o hospedeiro e interfertilidade) para comparar e separar espécies de *Ganoderma*. Alguns grupos de espécies segregados coincidiram com os gêneros estabelecidos, enquanto que outros grupos que pareciam homogêneos em suas características de cultura, pertenciam a dois ou mais gêneros na classificação convencional. Diante das limitações, esta tentativa pouco a pouco foi abandonada.

Nakasone (1990) usou e melhorou o sistema de código desenvolvido por Nobles (1965), para descrever 277 culturas de fungos ressupinados, não poróides.

O critério de interfertilidade, que em Basidiomycetes é realizado através de testes de pareamento entre monocariontes, tem complementado os estudos de morfologia e de caracterização das culturas em *Ganoderma*. Adaskaveg e Gilbertson (1987) através de testes de interfertilidade, encontraram reações de incompatibilidade possibilitando delimitar indivíduos de diferentes genótipos em populações naturais de *G. lucidum* e *G. tsugae*. Hseu (1990) demonstrou que coleções destas duas espécies na Ásia correspondem a espécies diferentes. Alguns exemplos mostram coerência entre interfertilidade e análise filogenética, mas há também casos de incongruências (Vilgalys & Sun 1994).

Na procura por outros métodos para identificar espécies em *Ganoderma*, Gottlieb *et al.* (1998) avaliaram o padrão isoenzimático de 135 isolamentos de 10 espécies de *Ganoderma*, mas nenhum padrão de bandas foi detectado para os grupos definidos morfológicamente.

Caracteres da macro e Micromorfologia, estudo da parede dos esporos, culturas e isoenzimas não são suficientes para delimitar espécies do gênero *Ganoderma*.

1.3.5. Estudos moleculares e filogenéticos

Nos últimos anos a classificação dos fungos e dos organismos em geral mudou, de uma abordagem puramente morfológica para um tratamento molecular, suportado pelas análises de sequências nucleotídicas de DNA que permite inferir o parentesco, as relações e tendências evolutivas entre os táxons. A descoberta da técnica PCR por Kary Mullis em 1983 (Batlett & Stirling 2003) tornou disponível sequências de “primers” que permitem amplificar vários segmentos de DNA nuclear e mitocondrial (White *et al.* 1990). Aliado a métodos de análise estatística, protocolos, procedimentos e equipamentos, essas novas abordagens têm contribuído para entender as mudanças genéticas que ocorrem durante a especiação (Gallardo 2011).

A análise filogenética dos fungos está permitindo obter um sistema de classificação mais estável e de maior significado evolutivo. Grande ajuda tem sido obtida para constatar a existência de espécies crípticas que dificilmente são separadas por análises morfológicas tradicionais, mas que estão reprodutivamente isoladas ou que são molecularmente diferentes (Hawksworth 2012).

Os estudos filogenéticos em fungos são realizados com o DNA ribossomal, pois os genes ribossomais são menos sujeitos as variações do meio. O DNA que codifica para RNA ribossomal aparece como um cluster de genes que se repetem e está formado pelos genes codificantes 18S, 5,8S e 28S, separados pelos espaçadores ITS1 e ITS 2 (Berbee & Taylor 2001).

Os genes 18S, 5.8S e 28S são parte estrutural do ribossoma e se caracterizam por ser altamente conservados. Destes três genes, o 18S é o mais conservado e usado para comparar organismos distantemente relacionados. O gene 28S já é mais variável e, portanto, útil para

comparar diferentes gêneros e em alguns casos diferentes espécies (Fungaro 2000). Os espaçadores ITS 1 e ITS 2, junto com a região intergênica (IGR) são as regiões mais variáveis e portanto são as mais indicadas para a separação de espécies (Moncalvo *et al.* 1995a).

A região ITS é considerada como o "código de barras" ou marcador padrão mais frequentemente usado em estudos de sistemática, filogenia e identificação de fungos em nível de espécie (Begerow *et al.* 2010).

Para os estudos moleculares do gênero *Ganoderma*, a região ITS do rDNA nuclear tem demonstrado possuir a variação da sequência nucleotídica suficiente para a sistemática e identificação das diferentes espécies. Pelo contrário, as sequências codificadas pela subunidade pequena nuclear (18S ou nSSU), da subunidade longa nuclear (25-28S ou nLSU) do rDNA ribossomal e a subunidade pequena mitocondrial (12S ou mtSSU) não oferecem a variação nucleotídica suficiente para inferir relações filogenéticas entre espécies de *Ganoderma* (Moncalvo *et al.* 1995a).

Estudos filogenéticos das regiões ITS e LSU, realizados com 14 taxa de *Ganoderma* mostraram alto nível de substituição nucleotídica no espaçador ITS 2, o que sugere que esta região evoluiu mais rápido do que ITS 1, mas em outros gêneros a divergência nucleotídica da região ITS 1 é maior do que em ITS 2. A variação intraespecífica foi < 2%, enquanto a divergência nucleotídica interespecífica foi > 6% (Moncalvo *et al.* 1995). Na região LSU foi observada uma baixa variação nucleotídica junto a tendência a alta transição, o que sugere que as espécies de *Ganoderma* divergiram recentemente e suporta as observações de Ryvarden (1991) e Moncalvo *et al.* (1995).

Hong & Hung (2004) realizaram estudos filogenéticos da região mtSSU rDNA e encontraram que esta região possui informação de valor filogenético no domínio conservado e no domínio variável. As 37 espécies de *Ganoderma* estudadas formaram seis grupos monofiléticos mas *Ganoderma lucidum* mostrou-se polifilético de acordo com a origem

geográfica. Neste mesmo trabalho, as relações com o hospedeiro assim como a presença de clamidósporo foram importantes para a sistemática do gênero.

Apesar do grande aporte filogenético para a sistemática de fungos oferecido pelos genes nucleares do rDNA ribossomal, aspectos da filogenia de Basidiomycota, como o baixo suporte dos nós internos, não foram resolvidos (Binder *et al.* 2005). Uma alternativa para resolver este baixo suporte nos nós de Basidiomycota é o uso de genes codificadores de proteínas. Alguns exemplos destes genes são: ATP sintase (atp6), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gapdh), RNA polimerase (rpb1 e rpb2), β -tubulina, actina, fator de elongação 1- α (tef1) e o gene do manganês superóxido dismutase (MN-SOD). Matheny *et al.* (2007) estudaram a filogenia de 160 taxa de Basidiomycota mostrando que os genes rpb2 e Tef-1 α produziram bons resultados com altos valores de suporte.

Utilizando os genes rpb1, rpb2, Tef-1 α , nITS e mSSU, Cao *et al.* (2012) propuseram o nome *G. lingzhi* para uma espécie muito utilizada em cultivos comerciais do leste da Ásia e conhecida como *G. lucidum*.

Recentemente o desenvolvimento da tecnologia de sequenciamento de próxima geração permitiu o sequenciamento do genoma completo das espécies *G. lucidum*, *G. meredithiae* e *G. applanatum* (Wang *et al.* 2015a, 2015b). Espera-se que novas informações subsidiem muitos aspectos biológicos e questões relacionadas com a filogenia e evolução de *Ganoderma*, assim como os diferentes mecanismos de degradação da lignina e a síntese de compostos farmacológicos.

1.4. Consideração taxonômica atual do gênero *Ganoderma*

Atualmente, *Ganoderma* está dividido em dois subgêneros: *Ganoderma* para espécies lacadas com uma paliçada de hifas infladas na superfície do píleo e *Elfvingia* para as espécies não lacadas sem a paliçada de células claviformes na superfície do basidioma. A espécie tipo para o subgênero *Ganoderma* é *Polyporus lucidus* (Curtis) Fr. e o basônimo é *Boletus lucidus*

Curtis. O subgênero *Elfvingia* está tipificado por *G. applanatum* (Pers.) Pat., sinônimo *Elfvingia applanata* (Pers.) P. Karst. e seu basônimo é *Boletus applanatus* Pers. que é oriundo da Europa e o material tipo está no herbário de Rijks em Leiden, Holanda (Richter 2015). Espécies do subgênero *Elfvingia* muitas vezes produzem basidiomas bastante grandes e visíveis e são, portanto, muito mais frequentemente encontradas no campo do que aquelas do subgênero *Ganoderma*, que por sua vez são muito cultivadas para fins medicinais (Richter *et al.* 2015).

Dentro do complexo *G. Applanatum-australe* do subgênero *Elfvingia*, *G. australe* (Fr.) Pat. pode ser distinguido de *G. applanatum* por apresentar basidiósporos maiores (Moncalvo & Ryvarden 1997). *Ganoderma australe* é comum nos trópicos e nunca foi registrado na Europa. O espécime tipo de *G. australe* não existe mais e o único material depositado em Kew Royal Botanic Gardens (Kew) sob esse nome é improvável que corresponda à coleção original (Ryvarden & Gilbertson 1993).

1.5. *Ganoderma* no Neotrópico

Ganoderma é um gênero cosmopolita com 60-80 espécies lacadas e 30-40 espécies não lacadas (Moncalvo 2000). Não se conhece exatamente a sua distribuição geográfica. *Ganoderma* é encontrado em bosques de coníferas e angiospermas na América do Norte e Canadá (Gilbertson & Ryvarden 1986), na China (Zhao 1989) e na Europa (Ryvarden & Gilbertson 1993). Embora as regiões tropicais sejam menos estudadas e os trabalhos filogenéticos estejam apenas começando, espécies do gênero ocorrem no leste da África (Ryvarden & Johansen 1980), Ásia tropical (Imazeki 1939), Malásia (Corner 1983) e no Neotrópico (Donk 1933, Furtado 1965, Ryvarden 2004). Na região tropical provavelmente teve origem esse gênero uma vez que grande número de táxons foram descritos nos trópicos. Acredita-se que ocorreu uma irradiação das regiões equatoriais para outras regiões e que as condições ambientais determinaram uma alta diversidade biológica (Moncalvo *et al.* 1995b).

O gênero *Ganoderma* é considerado o mais representativo e o de mais ampla distribuição em Ganodermataceae.

Os dois países do neotrópico com mais estudos em *Ganoderma* são o Brasil e a Argentina. As primeiras contribuições no Brasil foram os estudos realizados por Torrend (1920), Teixeira (1962a), Steyaert (1962), Furtado (1965) e Corner (1983). Entre as grandes contribuições para conhecer este gênero na Argentina figuram os trabalhos de Bazzalo & Wright (1982), Gottlieb et al. 1998, Gottlieb & Wright (1999a e b).

Ryvarden (2000), baseado em material tipo, descreveu para várias regiões do neotrópico 13 espécies lacadas. Dentre elas *Ganoderma concinnum* Ryvarden, *G. longistipitatum* Ryvarden e *G. multicornum* Ryvarden são novas espécies e *Ganoderma orbiformum* uma nova combinação. Ryvarden (2004) agregou mais 7 espécies, totalizando 20 espécies para o neotrópico.

Para o Brasil, espécies lacadas e não lacadas têm sido mencionadas, incluindo espécies consideradas restritas a Europa, como *G. lucidum* e *G. applanatum* (Patouillard 1889, Torrend 1920, Steyaert 1962, 1980; Furtado 1967; Fidalgo 1968; Bononi et al. 1981, 2008; Loguercio-Leite 2005, Loguercio-Leite & Wright 1991, Rajchernberg & Meyer 1990; Silva & Minter 1995; Gerber 1996; Gerber & Loguercio-Leite 1997; Góes-Neto 1999, Ryvarden 2000, 2004, Meijer 2001, 2003; Gilbertoni & Calvalcanti 2003; Góes-Neto et al. 2003; Loguercio-Leite et al. 2005; Groposo & Loguercio-Leite 2005; Torres-Torres & Guzman-Davalos 2005, 2012; Dreschsler-Santos et al. 2008, 2009; Torres-Torres et al. 2008; Baltazar & Gilbertoni 2009; Gilbertoni & Drechsler-Santos 2010; Westphalem et al. 2010, Gomez-Silva & Gilbertoni 2011; Gugliotta et al. 2011, Gomez-Silva et al. 2011, Torres-Torres et al. 2012). Torres-Torres et al. (2012) e Gugliotta et al. (2013).

Gottlieb *et al.* (1988), realizaram estudos isoenzimáticos incluindo uma espécie do complexo *applanatum-australe* e Gottlieb & Wright (1999a) analisaram a ultraestrutura da ornamentação do esporo para uma espécie lacada, *G. sessiliforme*, ambas coletadas no Brasil. Estudos moleculares no gênero realizados por Moncalvo & Buchanan (2008), considerando a região ITS do DNA incluíram uma coleção do complexo *applanatum-australe* do Brasil. Para as espécies lacadas, Lima *et al.* (2014) através de análise filogenética do DNA ribossomal das regiões ITS e LSU, identificaram as espécies *G. chalceum*, *G. multiplicatum*, *G. orbiforme*, *G. parvulum* e *G. aff. oerstedii*.

Na Colômbia, o gênero tem sido menos estudado; no entanto, estudos baseados na morfologia citam a existência de *G. australe*, *G. adpersum*, *G. amazonense*, *G. applanatum*, *G. brownie*, *G. chalceum*, *G. concinnum*, *G. fornicatum*, *G. lucidum*, *G. nitidum* e *G. neurosporum* (Ryvarden 2004, Vasco-Palacios & Franco-Molano 2013).

1.6. Aspectos ecológicos do gênero *Ganoderma*

Espécies de *Ganoderma* ocorrem em sua maioria como sapróbias sobre troncos mortos em avançado estado de decomposição, onde crescem degradando celulose, hemicelulose e lignina. *Ganoderma* e outros fungos Basidiomycetes são os únicos organismos que possuem a capacidade de produzir enzimas oxidativas e hidrolíticas para degradar lignina e são denominados fungos de podridão branca. Esses possuem a capacidade de romper ligações C_α-C_β, β-arilo, C₁ C_α, incluindo C-C aromático, reduzindo lignina a CO₂ e H₂O (Kirk 1981, Chen *et al.* 1982 & Hatakka 1994).

A atividade ligninolítica apresentada pelos fungos de podridão branca tem importância ecológica para a ciclagem do carbono e para vários processos biotecnológicos de produção de polpa de papel, bioconversão de resíduos agrícolas, alimentos, indústria têxtil, corantes e em biorremediação de substâncias poluentes (Elisashvili & Kachlishvili 2009).

As enzimas que se expressam durante a degradação da lignina são a lignina peroxidase (LiP) (EC1.11.1.14), manganês peroxidase (MnP) (EC1.11.1.13), lacase (EC 1.10.3.2) e peroxidases versáteis (EC 1.11.1.16).

A lignina peroxidase [(EC 1.11.1.14), 1,2-bis (3,4-dimethoxyphenyl) propane-1,3-diol: hydrogen-peroxide oxidoreductase] ou LiP, foi descoberta pela primeira vez em *Phanerochaete chrysosporium* (Basidiomycete). Várias isoformas são conhecidas nesta e em outras espécies de podridão branca e a sua expressão é variada. As isoenzimas de LiP são glicoproteínas com peso molecular de 38–46 kDa, ponto isoelétrico de 3.2-4.0, pH ótimo próximo de 3. A estrutura cristalina de LiP é globular, com uma dimensão de $50 \times 40 \times 40$ Å. Seu centro ativo é constituído por um grupo heme (Wong 2009, Zhou *et al.* 2012). LiP oxida substratos fenólicos e não fenólicos e não tem especificidade pelo substrato (Janusz *et al.* 2013).

Durante o ciclo catalítico o Fe (III) do grupo heme, contido no centro ativo da LiP é oxidado pelo peróxido de hidrogênio até um composto intermediário I (Fe IV), ou forma catiônica radical da ferroporfirina. Subsequentemente este composto intermediário I através de duas reações de redução consecutivas por doadores de elétrons presentes no substrato retornam a enzima a seu estado nativo. O agente redutor pode ser o álcool veratrílico (VA). A primeira redução do composto I por transferência de 1 elétron gera o composto II e um cátion radical VA (VA^+). Uma segunda redução de $1e^-$ retorna a enzima ao estado de oxidação férrico, completando o ciclo catalítico (Renganathan & Gold 1986).

Manganês peroxidase [EC 1.11.1.13, Mn (II): hydrogen-peroxide oxidoreductase, MnP], tem sua expressão regulada pela presença de Mn (II) no meio de cultura, e é estimulada por ácidos como glycolato, malonato, glucuronato e 2-hydroxybutyrato. Mn foi purificada de *P. chrysosporium* e é uma glicoproteína ácida com um ponto isoelétrico de 4.5, peso molecular médio de 45 kDa. MnP apresenta uma série de isoenzimas codificadas por um

cluster de genes estreitamente relacionados. O interesse em MnP é grande por ser de aplicação em fabricação de polpa de madeira, biobranqueamento e biorremediação (Janusz *et al.* 2003). A estrutura cristalina da MnP é muito parecida com a da LiP, seu centro ativo está constituído também por um grupo heme porfirina (Wong 2009).

No ciclo catalítico da MnP, esta oxida Mn (II) a Mn (III), que por sua vez oxida uma variedade de fenóis monoméricos, incluindo corantes, bem como compostos fenólicos da lignina. O ciclo catalítico implica na oxidação de Mn (II) pelo composto I (MnP - I) e um composto II (MnP - II) para se obter Mn (III) (Wong 2009).

Lacase (EC 1.10.3.2, benzenediol: oxygen oxidoreductase) ou LaC é parte da família multicobre oxidase, é uma polifenol oxidase com cobre (Hakulinen *et al.* 2002). A enzima Lac parece onipresente em todos os fungos de podridão branca e produzem várias isoenzimas codificadas por 4, 5 até 8 genes. Lacase apresenta um peso molecular de 60–80 kDa, ponto isoelétrico de 2.8–4.3. Lacase oxida compostos fenólicos e não fenólicos, aminas aromáticas, usando o oxigênio molecular comoceptor final de elétrons (Giardina *et al.* 2010).

O centro ativo da lacase contém íons cobre. Durante a catálise a lacase oxida dois fenóis, com abstração de um elétron, mediada pela redução de Cu^{+2} a Cu^{+1} , que por sua vez reduz O_2 a H_2O , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (Ferraz 2004).

As peroxidases versáteis são enzimas que combinam propriedades estruturais e funcionais de LiP e de MnP, mas atualmente pouco sobre seu gene ou região promotora é conhecido (Janusz *et al.* 2013).

A expressão de enzimas ligninolíticas é influenciada por grande número de isoenzimas, com diferentes cinéticas e características físico-químicas e diversas funções durante o ciclo de vida dos fungos. Uma série de fatores ambientais afetam fortemente os

padrões de expressão isoenzima em fungos de podridão branca (Pribnow *et al.* 1989, Gold & Alic 1993).

Estudos genômicos sobre os sistemas de degradação utilizados pelos fungos de podridão branca para a degradação da madeira, revelaram que existem ao redor de 61-148 cópias de genes que codificam para enzimas carboidratoativas (Cazymes), que representam de 14 a 17 famílias de genes, e atuam sobre a celulose cristalina. Em fungos de podridão marrom, outro grupo de fungos Basidiomycetes que degrada polissacarídeos da madeira, o genoma têm 32 a 68 cópias de genes para cazymes, em 9 a 12 famílias de genes. Os estudos moleculares também relatam a presença de enzimas oxidoredutases (Eastwood *et al.* 2011).

Esses estudos moleculares também demonstraram que todos os fungos de podridão branca apresentam glicosidase hidrolases (GH), famílias GH6 e GH7, que incluem celobiohidrolases, envolvidas no ataque a celulose cristalina, que estão ausentes em fungos de podridão parda (exceto Boletales). Outros genes encontrados são os genes que codificam para enzimas GH61, que apresentam mecanismos oxidativos de degradação dependentes de cobre para degradar a celulose cristalina e ligações (CBM1), os quais aumentam a concentração da enzima sobre a superfície da celulose cristalina (Floudas *et al.* 2012).

Algumas espécies de *Ganoderma* são parasitas facultativas que podem crescer em troncos em decomposição como saprófita até encontrar um hospedeiro mais susceptível e estabelecer uma relação parasita (Turner 1981). *Ganoderma* é um sério patógeno de plantas cultivadas como *Elaeis guineensis* (Arifin *et al.* 2000, Wong *et al.* 2012, Naher *et al.* 2013), *Coccus nucifera* (Kandan *et al.* 2009), *Camellia sinensis* (Sankaran *et al.* 2005, Tompon & Kunasakdaul 2014) e *Hevea brasiliensis* (Lim 1977). Na Índia, 144 espécies de árvores são hospedeiras de *Ganoderma* (Sankaran *et al.* 2005). Como parasita ocasiona grandes perdas econômicas em florestas de coníferas e em angiospermas que fornecem madeira em zonas temperadas (Gilbertson & Ryvarden 1987, Ryvarden 2004). Talvez a relação parasítica mais

estudada seja entre *Ganoderma* e *Elaeis guineensis* (palmeira de óleo) já que é o principal patógeno e produz uma doença devastadora que afeta a raiz e a parte basal do caule conhecida como podridão basal do caule (BCR). Esta doença é muito importante em palma de óleo em países do sudeste asiático, especialmente na Malásia e Indonésia, os maiores produtores de óleo de palma do mundo (Wong *et al.* 2012). Calcula-se que as perdas econômicas por causa da BSR excedem os 500 milhões de dólares por ano (Ommelna *et al.* 2012). As plantações de palmeira de óleo tem se expandido na Ásia e em outros locais, porque o óleo é usado na alimentação, na manufatura de alguns produtos, e como precursor de biodiesel (Hushiarian *et al.* 2013, Naher *et al.* 2013).

Quanto à identidade do agente causal da BCR em palmeira de óleo na Malásia e Indonésia são citadas 15 espécies de *Ganoderma* (Turner 1981). Inicialmente se pensou que se tratava de *G. lucidum* (W. Curt.: Fr.) Karst. (Thompson 1931). Outros trabalhos citaram *G. boninense* Pat., *G. miniatocinctum* Steyaert, *G. chalceum* (Cooke) Steyaert, *G. tornatum* (Pers.) Bres., *G. zonatum* Murill e *G. xylonoides* Steyaert (Steyaert 1967). Posteriormente, através de testes de interfertilidade, análises microscópicas e de varredura, assim como análise molecular do DNA ribossomal da região ITS por técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) e AFLPS (polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados), *G. boninense* mostrou ser a única espécie responsável por produzir a doença (Ho & Nawawi 1985, Pilotti *et al.* 2004, Utomo & Niepold 2005).

Recentes estudos mostraram alto nível de variação genética entre monocariontes de *G. boninense*, o que sugere que *G. boninense* é geneticamente heterogêneo, por estar em diferentes localizações geográficas ou pelo cruzamento dos isolados ao longo de gerações (Pilotti 2003). Deste modo, o agente patogênico pode ser proveniente de uma mesma espécie contendo uma grande variação genética ou de espécies estreitamente relacionadas (Zakaria *et al.* 2005). Através do método de múltipla PCR-DNA e de características morfológicas

encontrou-se que além de *G. boninense*, *G. zonatum* e *G. miniatocinctum* estão associados com a podridão basal do caule (BCR) em palmeira de óleo na Malásia (Wong *et al.* 2012).

1.7. Importância medicinal-econômica

Os basidiomas de espécies de *Ganoderma* têm sido amplamente utilizados na medicina tradicional chinesa devido a presença de compostos ativos de uso farmacológico para o tratamento de diversas doenças, ao ponto de se ter convertido numa milionária indústria nos últimos anos (Li *et al.* 2013). *Ganoderma lucidum* tem demonstrado potencial no tratamento de doenças como câncer, diabetes e da síndrome da Imunodeficiência adquirida (SIDA) (Sanodiya *et al.* 2009) possuindo propriedades analgésicas e de relaxante muscular (Zhang *et al.* 2011). Os extratos de *G. lucidum* aumentam a secreção de citocinas de células do sistema imunológico que levam ao aumento da atividade celular e sobrevivência de células imunitárias relacionadas com macrófagos e linfócitos (Bach *et al.* 2009, Mantovani & Sica 2010). No folclore chinês *Ganoderma* está associado a fortuna e a boa saúde (Chang & Miles 2004).

As leguminosas são plantas de grande valor econômico nas regiões tropicais, onde são utilizadas com propósitos de reflorestamento, como forrageiras, para o enriquecimento e a fixação de nitrogênio no solo, como quebra-ventos e como ornamentais. Neste último caso é notório seu uso em arborização urbana em diversos países tropicais. No Brasil, vários autores já reportaram como as leguminosas são importantes não só em riqueza de espécies, mas em termos de maior frequência de indivíduos por espécie (Kurihara *et al.* 2005).

Entre as plantas mais usadas na arborização no Brasil figuram ao redor de 20 espécies de leguminosas (Prefeitura de São Paulo 2015, Fernández *et al.* 2002). As leguminosas mais utilizadas na arborização de São Paulo são *Caesalpinia pelthoporoides* Benth., *Holocalyx balansae* Micheli, *Senna multifuga* L. C. Rich., *Cassia fistula* L., *Caesalpinia pulcherrima* L. e *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze (Prefeitura de São Paulo 2015. Da listagem publicada

Tipuana tipu foi amplamente estudada e *Ganoderma* sp. foi citado como o principal responsável pela biodeterioração e queda da espécie (Brazolin 2009). Em Cali, entre as espécies de leguminosas mais usadas em arborização urbana estão *Cassia siamea* Lam., *Cassia fistula* L., *Bauhinia variegata* L., *Delonix regia* (Bojer Ex. Hook) RAF, *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. E *Caesalpinia pelthophoroides* Benth. (Dagma 2009). Bolaños et al. 2011 constataram que de varias familias botânicas, as leguminosas foram as plantas que apresentaram maior ocorrência de *Ganoderma*.

2. OBJETIVOS

Geral

- ✓ Contribuir para a taxonomia do gênero *Ganoderma* e obter informações preliminares que subsidiem futuro controle da doença em leguminosas utilizadas em arborização urbana.

Específicos

- ✓ Identificar morfológica e molecularmente as espécies do gênero *Ganoderma* que crescem em diferentes leguminosas utilizadas em arborização urbana.
- ✓ Determinar a atividade enzimática de espécies de *Ganoderma* que crescem em diferentes espécies de leguminosas utilizadas na arborização urbana e em espécies sapróbias relacionando a fisiologia do fungo ao seu papel ecológico.
- ✓ Contribuir com informações taxonômicas, moleculares e filogenéticas para o gênero *Ganoderma* coletados no Neotrópico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Áreas de coleta

Espécimes do gênero *Ganoderma* presentes em árvores de leguminosas utilizadas em arborização urbana nas cidades de São Paulo e Ubêrlândia no Brasil e em Cali e Palmira na Colômbia e em áreas de conservação, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, Parque Estadual da Cantareira em São Paulo/SP, Parque Estadual da Serra do Mar- Núcleo Santa Virgínia, município de São Luis do Paraitinga/SP, Brasil e no Ecoparque Pance em Cali, Colômbia, espécimes foram coletados durante 2012-2013 (Figura 1).

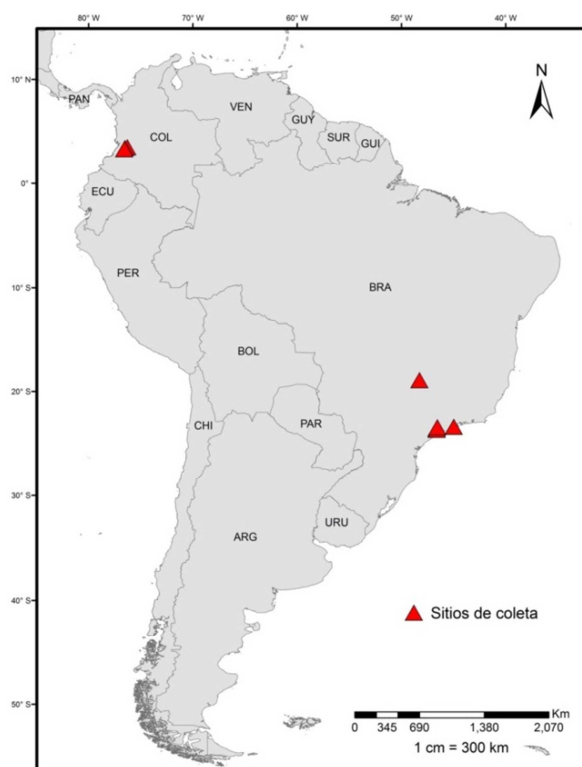


Figura 1. Áreas de coleta de espécimes de *Ganoderma* em árvores vivas de leguminosas e troncos caídos (Mapa elaborado com o programa ArcGis versão 10.2).

Cidade de São Paulo

A cidade de São Paulo tem por coordenadas geográficas 23° 32'56" S 46° 38' 19" W, altitude média de 860m, clima subtropical, com temperatura média de 19,2°C umidade relativa entre 70 e 80%, com ventos vindos do litoral que deixam o ar mais úmido. A precipitação média anual é de 1.450 mm, concentrados principalmente no verão. A cidade possui 75 parques e uma superfície verde total de 45.258.909 m² (Lima de Toledo 2004).

Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI)

Está localizado ao sudeste do município de São Paulo entre os paralelos 23°38' 08" S e 23°40' 18" e os meridianos de 46° 36' 48" W e 46° 38' 00" W, com altitude média de 798 m, temperatura média de 23,9°C e máxima de 36,8°C e umidade relativa média entre 13-100%. O PEFI é um remanescente de mata atlântica inserido na área urbana do município de São Paulo, com vegetação predominantemente ombrófila densa. O PEFI foi criado em 1969 e possui uma área de 526,38 ha (Fernández *et al.* 2002, Santos & Funari 2002).

Parque Estadual da Cantareira (PEC)

Está localizado na Serra da Cantareira, entre os municípios de Caieiras, Guarulhos, Mairiporã e São Paulo, com coordenadas 23°27'23.08" S e 46°38'08.15" W; apresenta altitudes médias de 860 a 1.215m, temperaturas médias maiores que 21°C em fevereiro e média mínima de 14, 4°C em julho. O PEC foi criado em 1963 e possui área de 7.916,5 ha de mata Atlântica, dividida em quatro núcleos: Águas Claras, Cabuçu, Engordador e Pedra Grande. A vegetação do parque corresponde a floresta ombrófila densa em diversos estádios de regeneração (Secretaria do Meio Ambiente 2000).

Parque Estadual da Serra do Mar (PESM) - Núcleo Santa Virgínia

O Parque Estadual Serra do Mar (PESM), consta de 315.390ha, distribuídas por 23 municípios de São Paulo (Secretaria de Estado de Meio Ambiente 2006). Este parque é administrado a partir de oito núcleos: Picinguaba, Cunha, Curucutu, Santa Virgínia,

Caraguatatuba, São Sebastião, Itutinga Pilões, e Itariru (Fundação Florestal 2012). O núcleo de Santa Virgínia do PESH, está localizado na bacia hidrográfica do Rio Paraíba, nas coordenadas geográficas 45°03'O e 23°24' a 23°17'S, é parte dos municípios São Luiz do Paraitinga, Natividade da Serra, Cunha e Ubatuba. A altitude varia de 860m a 1650m, temperatura média anual entre 20°C a 24°C e a precipitação anual varia entre 1500-4000mm. A vegetação é caracterizada pela floresta Ombrófila Densa Montana (Secretaria do Meio Ambiente 2006).

Cidade de Ubêrlândia (UB)

Ubêrlândia está localizada no Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, Estado de Minas Gerais, Região Sudeste do Brasil nas coordenadas geográficas 18°55'23" S e 48°17'17" O. A altitude varia de 800 a 900m. A precipitação média anual excede 1.600 mm., a umidade relativa varia de 85% a 64%, com média de 76%, sendo mais baixa durante a seca. A temperatura média anual é de 22° C. A vegetação característica do município de Uberlândia é o cerrado (Prefeitura de Ubêrlândia 2008).

Cidade de Cali

A cidade de Cali, está nas coordenadas de 3° 27'00"N 76° 32' 00" W, possui altitude média de 1.000m, com clima tropical seco. A média de precipitação anual varia de 900mm nas áreas mais secas a 1.800 mm nas áreas mais úmidas, com média de 1.000 mm na maior parte da área metropolitana. A temperatura média é de 23°C com uma média mínima de 18,7 °C e uma média máxima de 30°C, com um máximo absoluto de 38°C e mínima absoluta de 15°C. Estações secas ocorrem de dezembro a fevereiro e de julho a agosto e a estação chuvosa de março a maio e de setembro a novembro. Na parte ocidental da cidade estão os Farallones de Cali, que fazem parte da Cordilheira Ocidental dos Andes Colombianos. As áreas verdes da cidade totalizam 10.914.985m² (Salazar & Palácios 2003).

Ecoparque Rio Pance (ERP)

Localizado no departamento do Valle do Cauca, município de Cali, Colômbia, quilômetro 12 da via Cali-Pance. Possui uma extensão de 59,9ha, precipitação de 1.378 a 1.517 mm, temperatura média de 24°C e umidade de 75% com vegetação de transição de floresta seca e úmida pré-montana, com altitudes de 1.125 - 1.240m (Botina & García 2005).

Cidade de Palmira

A cidade de Palmira está localizada ao sul do departamento do Valle do Cauca, nas coordenadas 3°31'48" de latitud norte e 76°81'13"O, possui altitude média de 1.001m e temperatura média de 20°C. A precipitação anual varia entre 2.000-2.100mm. O clima é tropical seco (Alcaldía Municipal de Palmira 2012).

3.2 Coleta de material

Basidiomas de espécimes do gênero *Ganoderma* presentes em leguminosas vivas afetadas e em troncos podres foram coletados de abril 2012 a novembro de 2013. Os basidiomas foram retirados do substrato com todas suas estruturas, colocados em sacos de papel previamente marcados e transportados ao laboratório do Instituto de Botânica de São Paulo e ao laboratório da Universidad del Valle na Colômbia, para estudo de caracteres morfológicos macro e microscópicos e isolamento e conservação em meio de cultura. Além do fungo, de cada árvore foram retirados 10g de madeira e colocados no saco de coleta junto ao espécime. O material coletado foi submetido a secagem em estufa a 50°C, durante uma semana, congelado por mais uma semana e colocado em sacos de papel e saco plástico (Fidalgo & Bononi 1984). Os espécimes foram incluídos no herbário SP do Instituto de Botânica de São Paulo e no herbário CUVC da Universidad del Valle na Colômbia.

3.3. Identificação morfológica

As características macroscópicas registradas de cada espécime coletado foram: cor, diâmetro, forma, superfície, margem, textura e espessura do píleo; cor e número de poros por mm na superfície himenial; comprimento e coloração dos tubos; cor, espessura e características do contexto e presença ou não de estipe. Os caracteres microscópicos verificados foram: tamanho, forma e cor do esporo, sistema hifálico, tamanho e forma dos basídios utilizando os reagentes KOH 4%, floxina 1% e Melzer (Gilbertson & Ryvarden 1986, Adaskaveg e Gilbertson 1988, Ryvarden 2000, Ryvarden 2004, Gugliotta *et al.* 2011). Os caracteres macroscópicos foram observados usando lupa estereoscópica Nikon, modelo SMZ-1500 e os microscópicos com microscópio óptico de luz Nikon, modelo Eclipse Ni-U 90. Imagens foram capturadas com uma câmera digital Nikon, modelo DS-Ri1 U3, Software NIS Elements Br. As medidas dos basidiósporos foram realizada com 20 esporos.

3. 4. Análise da ultraestrutura da parede dos basidiósporos

Para os estudos de ultraestrutura de todos os espécimes coletados, foram feitas montagens tanto de esporos como de pedaços do himenóforo (para espécimes sem esporada). Pequenos fragmentos do himenóforo foram cortados sob lupa, colocados na fita de carbono já aderida ao “stabb”, secos em sílica gel e banhados em ouro por cinco minutos (Pegler & Young 1973, Gottlieb & Whright 1999).

Do material esporulado, esporos coletados de basidiomas de *Ganoderma* foram colocados em peneiras de 0,25 μ M para filtragem e armazenados em etanol 70%. Posteriormente foram submetidos a ultrassonografia e centrifugação por 5 minutos. Após foram colocados nos suportes em fita de carbono e levados à câmara dessecadora durante 12 horas. Antes da observação ao microscópio de varredura foi dado um banho de ouro durante cinco minutos em cada amostra (Pegler & Young 1973, Gottlieb & Wright 1999 a, b).

3.5. Identificação das plantas

Para identificação das plantas hospedeiras de espécimes de *Ganoderma* em São Paulo, contou-se com a ajuda do inventário e identificação das árvores com presença do fungo feito previamente pelos botânicos da prefeitura do município de São Paulo. Além disso, observou-se a planta em estado fértil, ou seja, com presença de flores ou de frutos. Na Colômbia contou-se com a ajuda do botânico Robert Tulio González da Universidade Nacional de Colômbia e do curador do herbário CUVC.

3.6. Isolamento em meio de cultura e conservação

Cada basidioma coletado foi conduzido à câmara de fluxo laminar do Núcleo de Pesquisa em Micologia do IBT ou no laboratório de microbiologia da Universidad del Valle. O basidioma foi partido pela metade e do contexto foram retirados pedaços de aproximadamente 1 cm², colocados no meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) preparado previamente. Uma vez crescidos em placa-de-petri e sem contaminação, procedeu-se a conservação pelos métodos de Castelani (água destilada estéril), tubo com meio de cultura, papel filtro liofilizado, a fim de ter o material disponível e pronto para ser armazenado na coleção de cultura do Instituto de Botânica de São Paulo (CCIBT).

3.7. Análise de culturas isoladas

De cada linhagem obtida e cultivada no meio de cultura BDA, foram retirados discos com micélio, com um furador de rolha de diâmetro igual a sete mm. Para auxiliar as medições, a tampa de cada placa-de-petri foi marcada com duas retas perpendiculares, cujo ponto de cruzamento coincidiu com o centro do inóculo. A avaliação do crescimento foi feita através de medidas do diâmetro nos dois quadrantes a cada dois dias, durante 8 dias. De cada placa foram feitas três repetições. Além de medir o crescimento foram analisadas algumas

características da colônia como: cor, zonação, textura, pigmentação e formação de clamidósporos. As culturas foram mantidas em estufa à temperatura de 26°C.

3.8. Teste enzimático qualitativo

Para avaliar o complexo enzimático dos 42 espécimes de *Ganoderma* obtidos em cultura, tanto no Brasil como na Colômbia, foram realizados testes enzimáticos qualitativos em placas-de-petri com os meios: Extrato de Malte Agar 2% (MEA) e o corante azul brilhante de remazol R-RBBR para sistema degradativo lignocelulolítico (Okino *et al.* 2000; Machado *et al.* 2005, Vitali *et al.* 2006); guaiacol e α -naftol para lacase; pirogalol para peroxidases (Stalpers 1978; Schwyn & Neilands, 1997) e enzimas celulolíticas com vermelho congo, CMC e meio basal (Jo *et al.* 2011). A produção de compostos de baixa massa molar, quelantes de ferro (sideróforos), foram avaliados por cromo azurol S - CAS (Milagres *et al.* 1999). Para igualar a idade fisiológica dos cultivos, cultivou-se cada linhagem no meio de cultura MEA por 7 dias, dos quais foram retirados discos de micélio com 5 mm de diâmetro e inoculados no centro das placas. Foram avaliados tanto o crescimento do micélio como o diâmetro do halo formado em cada tratamento. Em todas as placas, duas retas perpendiculares foram marcadas, cujo ponto de cruzamento coincidiu com o centro do inóculo. As medições do crescimento e do halo foram feitas nos dois quadrantes a cada dois dias, durante 7 dias. Todo o experimento foi feito em triplicata e o tratamento estatístico dos dados foi realizado no programa SAS, através de análise fatorial, tendo como fatores as linhagens e os meios de cultura.

3.9. Estudo molecular

Discos de 5 mm de micélio de cada linhagem isolada foram colocadas em 100 ml do meio líquido ME (Extrato de malte-dextrose-peptona) a 2%, durante uma semana. Uma vez completamente colonizada a superfície do meio líquido, o material foi, filtrado com bomba de

vácuo, lavado com água destilada estéril, seco com papel filtro estéril e colocado em sacos de papel alumínio estéril para posterior extração e amplificação do DNA.

3.9.1. Extração manual de DNA

Esta fase foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Raeder & Broda (1985) com algumas modificações. Para isto, prepararam-se 50 ml do seguinte buffer de extração (tabela 1).

Tabela 1. Solução buffer de extração

Reagentes	Concentração
Tris-HCL, pH:8,0	200 mmol
NaCL	250 mmol
EDTA	25 mmol
SDS	0,5 %

Para a extração do DNA, 50 mg de micélio de cada linhagem foram maceradas em nitrogênio líquido, colocadas em tubo Eppendorf® com 500 µl de buffer de extração e agitadas em vortex durante 5 segundos. Em seguida os tubos Eppendorf® foram colocados em banho maria a 65°C durante uma hora. Finalizado este tempo, a cada tubo Eppendorf®, adicionou-se 350 µl de fenol equilibrado, misturou-se em vortex durante 5 segundos, foi acrescentado 150 µl de clorofórmio e centrifugado por 45 minutos a 13.000 rpm. Esta fase foi repetida mais uma vez. Da fase aquosa superior resultante 500 µl foram retirados, misturados com 500 µl de clorofórmio em outro Eppendorf® e centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm. Transcorrido este período 300-400 µl foram resgatados em outro Eppendorf®, ao qual adicionou-se a metade deste volume de álcool isopropílico e centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm.

Posteriormente, o álcool isopropílico foi retirado e acrescentado 100-120 µl de álcool absoluto, deixando o material no freezer a -20°C durante uma noite. No dia seguinte o material foi centrifugado durante 10 minutos a 13.000 rpm, o álcool absoluto foi retirado e

três lavagens com álcool 70% foram feitas. Os Eppendorf® secaram a temperatura ambiente, para eliminar o álcool completamente. Finalmente, a cada Eppendorf® adicionaram-se 30 µl de TE e 1 µl de RNasa, e foram levados ao banho maria a 37°C por meia hora.

A visualização da extração do DNA foi realizada em géis de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5X (Tris-borato 0,045M; EDTA, 0,001M) corridos com o Gel RED.

A quantificação da concentração do DNA extraído foi realizada por espectrofotometria Nanodrop, usando o equipamento Nanodrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific. Para a leitura, 1µl de cada amostra de DNA extraída foi verificada. Terminada a leitura, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até realizar a PCR.

3.9.2. Reação em cadeia da polimerase – PCR (Amplificação de DNA)

Para a realização dos testes para PCR, experimentos baseados em trabalhos de Vilgalys & Hester (1990), Moncalvo *et al.* (1995a), Glottieb *et al.* (2000), Binder *et al.* (2005) e Nascimento *et al.* (2011) foram usados. O primer utilizado para gerar os moldes ITS para sequenciamento foram BMC–CR (5'-GTACACACCGCCCGTCG-3', posição 1624-1640 em *S. cerevisiae* 17S rRNA) e LRI (5'-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3').

A reação ou solução mix e as condições para a PCR foram realizadas da seguinte forma (tabela 2).

Tabela 2. Solução Mix para a PCR

Reagentes	Concentração	
	inicial	final
Buffer Taq	10x	1X
dNTP's	1.25 mM	0.2mM
Primer I(forward)	10 µM	0, 4 µM
Primer 2 (reverse)	10 µM	0, 4 µM
Mg CL2	25 mM	3 mM
Taq Polymerasa	5U/ µl	2.5 /µl
ADN	30 ng/µl	60 ng/µl
Água	-	-

- Varia de acordo com o número de amostras

As condições para conduzir a PCR para este par de primers foram feitas de acordo com Vilgalys & Hester (1990) da seguinte forma:

1. Desnaturação a 94°C durante 5 minutos
2. Desnaturação a 94°C durante 1 minuto
3. Alinhamento dos primers a 50°C durante 45 segundos
4. Extensão a 72 °C durante 1 minuto
5. Voltar a 2 (desnaturação a 94°C durante 1 min.) e repetir 30 vezes
6. Extensão a 72 °C durante 7 minutos
7. Manter a 16°C por 15 minutos
8. Finalizar

Para gerar os moldes SSU para sequenciamento foram utilizados os primers BMS05 (5'-TTAATTTTGGTTCNGATTGAACG-3') e BMS173 (5'TGCTATGACTTTTGAGATGTTAC-3'). A reação ou solução mix foi a mesma citada para ITS e as condições para conduzir a PCR para este par de primers foram feitas de acordo a Hong & Jung (2004) da seguinte forma:

1. Desnaturação a 94°C durante 3 minutos
2. Desnaturação a 94°C durante 30 segundos
3. Alinhamento dos primers a 50°C durante 30 segundos
4. Extensão 72 °C durante 2 minutos
5. Voltar a 2 (Desnaturação a 94°C durante 30 segundos) e repetir 30 vezes
6. Extensão a 72 °C durante 10 minutos
7. Manter a 16°C por 15 minutos
8. Finalizar

Para os moldes LSU, os primers LROR (3'-ACCCGCTGAACTTAAGC-5') e LR7 (3'TACTACCACCAAGATCT-5') foram utilizados. As condições para conduzir a PCR foram as seguintes (Korbie & Mattick 2008):

1. Desnaturação a 94°C durante 2 minutos
2. 5 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos
3. Alinhamento dos primers a 54°C durante 50 segundos
4. Extensão a 72 °C durante 1 minuto e 20 segundos (diminuição de 1°C até atingir 50°C)
5. 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos
6. Alinhamento a 50°C por 50 segundos
7. Extensão a 72 °C por 1 minuto e 20 segundos
8. Extensão a 72°C por 10 min
9. Finalizar

Para gerar os Moldes para MnP, as mesmas condições que as realizadas para ITS foram seguidas. Foram utilizados os primers E8R (5'CGG AGY TGS GTC TCG ATG AAG-3') e E2FB (5'-GAC CTS CAG AAG AAC CTG TTC SA-3').

Para alguns exemplares foram testados os “kits” de extração e amplificação G2N70 GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit e P4600 ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix, da Sigma-Aldrich, seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante. Utilizaram-se fragmentos de basidiomas e micélio liofilizado.

Para a análise molecular os produtos de PCR obtidos foram enviados para sequenciamento à MacroGen-Korea. As sequências obtidas das duas fitas foram comparadas diretamente com as sequências depositadas na base de dados do GenBank, usando a ferramenta de busca de alinhamento local básica (BLAT-N). As sequências parciais das regiões ITS, LSU e SSU foram editadas com o programa Chromas PRO versão 2.1 e alinhadas com o programa MAFFT, versão 5 (Katoh *et al.* 2005).

As sequências ITS, SSU, LSU e MnP obtidas neste trabalho foram analisadas através de uma análise concatenada. Numa primeira aproximação foram consideradas todas as

sequências para espécies lacadas e não lacadas de *Ganoderma* reportadas no GenBank. Busca especial foi dada a sequências de espécies citadas para a América do Sul. Desta primeira análise foram suprimidas as sequências de espécies que não tinham relação com as espécies encontradas e um grupo de sequências referências de outras espécies de *Ganoderma* do GenBank foram selecionadas para comparação. Estas sequências foram selecionadas por ter várias regiões sequenciadas e maior longitude da sequência nucleotídica.

A reconstrução da história filogenética foi inferida pelo método de máxima parsimônia (MP), máxima verosimilhança (MV) e inferência bayesiana (MCMC). Para a análise de parsimonia foi utilizado PAUP* 4.0 v.b.10 (Swofford, 2002), para a análise MV e MCMC foi encontrado o melhor esquema de partição e modelos de substituição nucleotídica usando o critério de informação bayesiana (BIC) implementado no programa Partition Finder, versão 1.1.0 (Lanfear *et al.* 2012). A análise ML foi realizada no software GARLI, versão 2.0 (Bazinet *et al.* 2014).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 56 espécimes de *Ganoderma*, desse total, 39 sobre tronco de árvores vivas de 15 espécies diferentes de leguminosas e 17 em árvores mortas nas cidades de São Paulo e Uberlândia no Brasil e Cali, Pance e Palmira, na Colômbia. Nas árvores vivas, foram identificadas 1 espécime de *G. subamboinense* (P. Henn.) Bazz. & Wright, 8 espécimes de *G. gibbosum* (Blume & T. Nees) Pat., 3 de *G. multiplicatum* (Mont.) Pat. e 18 do complexo *G. parvulum* Murr. Em árvores mortas foram encontradas 11 espécimes de *G. australe* (Fr.) Pat., 6 de *G. gibbosum* (Blume & T. Nees) Pat e 1 de *G. multiplicatum* (Mont.) Pat. (Tabelas, 3, 4 e 5).

4.1. Espécies de *Ganoderma*, locais de coleta, hospedeiros em áreas protegidas e urbanas

A presença do gênero *Ganoderma* em leguminosas vivas utilizadas em arborização urbana em São Paulo e Uberlândia foi registrada em seis espécies diferentes de leguminosas (*Caesalpinia ferrea* C. Mart., *C. pelthoporoides* Benth., *Inga vera* Willd., *Holocalyx balansae* Micheli, *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit e *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze.) sendo que *C. pelthoporoides* é a espécie com maior número de basidiomas coletados. A espécie de *Ganoderma* não lacadas mais frequentes é *G. gibbosum*. No Parque Estadual da Cantareira (PEC) foram coletados 12 espécimes, todos não lacados, correspondendo apenas a *Ganoderma australe* e *G. gibbosum*. No PEFI foram encontradas tanto espécies lacadas como não lacadas. No Núcleo de Santa Virgínia foi encontrado apenas 1 espécime de *G. australe* em tronco morto. Na Colômbia, na cidade de Cali, as espécies de *Ganoderma* ocorreram em 11 espécies diferentes de leguminosas (*Bauhinia purpurea* (L.) Benth, *Calliandara pittieri* Standl., *Cassia fistula* L., *Cassia siamea* Lam., *Caesalpinia pelthoporoides*, *Clitoria fairchildiana* Howard, *Delonix regia* (Bojer Ex.Hook) Raf, *Inga edulis* Mart., *Haematoxylum brasilleto* H. Karst., *Leucaena leucocephala*, *Pithecelobium dulce* (Roxb.) Benth.,

principalmente em *Cassia fistula* L. e em segundo lugar em *Leucaena leucocephala*. No ecoparque Pance, município de Cali, foi encontrado *G. multiplicatum* e *G. parvulum* em *Caesalpinia pelthophoroides* e *Cassia fistula*. Em Palmira foi encontrado *Ganoderma* sp. sobre *Delonix regia* (Bojer Ex. Hook) Raf. Nas árvores vivas a parte mais comum de ocorrência do fungo foi na base da árvore (0-10 cm de altura) provavelmente porque o sistema radicular das leguminosas enfrenta condições de estresse quando plantado em espaços urbanos onde são submetidos a injúrias pelo pisoteio de animais e do próprio homem (Dagma 2009). Em troncos podres as espécies de *Ganoderma* crescem em qualquer posição. As seguintes tabelas (3 a 5) sumarizam o registro de espécimes em todos os locais coletados.

Tabela 3. Espécimes de *Ganoderma* coletados em leguminosas vivas nas cidades de São Paulo e Uberlândia.

ESPECIMES No.	FUNGO	LOCAL	HOSPEDEIRO
SP417773	<i>G. subamboinense</i>	São Paulo	<i>Caesalpinia ferrea</i>
SP417774	<i>G. gibbosum</i>	São Paulo	<i>Inga vera</i>
SP466392	<i>G. gibbosum</i>	São Paulo	<i>Caesalpinia ferrea</i>
SP466393	<i>G. gibbosum</i>	São Paulo	<i>Holocalyx balansaei</i>
SP417797	<i>G. multiplicatum</i>	São Paulo	<i>Caesalpinia pelthoporoides</i>
SP417776	<i>G. gibbosum</i> .	São Paulo	<i>Caesalpinia pelthoporoides</i>
SP417798	<i>G. gibbosum</i>	São Paulo	<i>Caesalpinia pelthoporoides</i>
SP417777	<i>G. gibbosum</i>	São Paulo	<i>Leucaena leucocephala</i>
SP417778	<i>G. multiplicatum</i>	São Paulo	<i>Tipuana tipu</i>
SP417799	<i>G. gibbosum</i>	São Paulo	<i>Caesalpinia pelthoporoides</i>
SP417795	<i>G. gibbosum</i>	Uberlândia	<i>Caesalpinia pelthoporoides</i>

Tabela 4. Espécimes de *Ganoderma* coletados em troncos mortos no Parque Estadual da Cantareira, Jardim Botânico de São Paulo e Uberlândia.

ESPECIME	LOCAL	FUNGO
SP417782	PEC	<i>G. australe</i>
SP417783	PEC	<i>G. australe</i>
SP417784	PEC	<i>G. australe</i>
SP417785	PEC	<i>G. australe</i>
SP417791	PEC	<i>G. australe</i>
SP417786	PEC	<i>G. gibbosum</i>
SP417787	PEC	<i>G. australe</i>
SP417788	PEC	<i>G. gibbosum</i>
SP417789	PEC	<i>G. australe</i>
SP417792	PEC	<i>G. australe</i>
SP417796	PEC	<i>G. australe</i>
SP417793	PEC	<i>G. australe</i>
SP417780	PEFI	<i>G. multiplicatum</i>
SP417781	PEFI	<i>G. gibbosum</i>
SP-(IBT-4)	PEFI	<i>G. gibbosum</i>
SP417794	Ubêrlândia	<i>G. gibbosum</i>
SP445969	Santa Virginia	<i>G. australe</i>

Tabela 5. Espécimes de *Ganoderma* coletados em leguminosas vivas na Colômbia.

ESPECIME No.	LOCAL	FUNGO	HOSPEDEIRO
CUVC60070	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Cassia fistula</i>
CUVC60071	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Cassia fistula</i>
CUVC60072	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Cassia fistula</i>
CUVC60073	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Cassia fistula</i>
CUVC60074	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Cassia fistula</i>
CUVC60075	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>
CUVC60076	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Cassia fistula</i>
CUVC60077	EPP	<i>G. multiplicatum</i>	<i>Caesalpinia pelthoporoides</i>

Tabela 5. Continuação.

ESPECIME No.	LUGAR	FUNGO	HOSPEDEIRO
CUVC60078	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Cassia fistula</i>
CUVC60079	Cali	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Cassia fistula</i>
CUVC60080	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Cassia fistula</i>
CUVC60081	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>
CUVC60082	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>
CUVC60083	EPP	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Cassia fistula</i>
CUVC60084	EPP	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Cassia fistula</i>
CUVC60085	EPP	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Cassia fistula</i>
CUVC60086	EPP	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Cassia fistula</i>
CUVC60087	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Phitecelobium dulce</i>
CUVC60088	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>
CUVC60089	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Cassia siamea</i>
CUVC60090	Palmira	<i>Ganoderma</i> sp.1	<i>Delonix regia</i>
CUVC60091	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Calliandra pittieri</i>
CUVC60092	Cali	<i>G. gibbosum</i>	<i>Inga edulis</i>
CUVC60093	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Bauhinia purpurea</i>
CUVC60094	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Clitoria fairchildiana</i>
CUVC60095	Cali	Complexo <i>G. parvulum</i>	<i>Hematoxylum brasiletto</i>

4.2. Culturas obtidas e características macroscópicas e microscópicas das culturas isoladas

De todos os espécimes coletados tanto em árvores vivas como em tronco podre foram obtidas 44 culturas puras. Estas culturas foram preservadas pelos métodos de tubos-de-ensaio com meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA), Castellani, papel filtro e liofilização.

Quanto às características culturais de todas as linhagens do gênero *Ganoderma*, a cor do micélio apresentou-se sempre branca sendo, portanto, um parâmetro constante; algumas culturas apresentaram zonação da colônia independentemente de ter sido coletada em árvores vivas ou mortas. Na maioria das culturas o tipo de crescimento é felpudo é só algumas culturas apresentaram um micélio estriado. Uma linhagem do complexo *G. parvulum* (CC-9)

apresentou conglomerado de células. A pigmentação das hifas ocorreu com o decorrer do tempo e é talvez o parâmetro mais variado. Vale a pena destacar que a pigmentação é uma característica que interfere para fazer os estudos moleculares, uma vez que dificulta uma boa extração e qualidade do DNA. Nem todas as linhagens apresentaram clamidósporos, mas no caso de *G. subamboinense* esta característica é citada como importante para a determinação da espécie (Moncalvo et al. 1995b, Gottlieb & Wright 1999b). Este parâmetro não tem sido muito estudado pelos taxonomistas e precisa ser avaliado com mais cuidado. Neste estudo clamidósporos foram encontrados em linhagens lacadas de *Ganoderma* e ausente em linhagens não lacadas. Segundo Moncalvo *et al.* (1995a) este parâmetro e relações filogenéticas permitiram separar isolados norteamericanos de europeus de *G. lucidum*. Hifas finas, septadas e com ansas caracterizaram em todas as linhagens. As tabelas 6 e 7, e a figura 2 contêm informações das linhagens. Foi observado que em algumas delas após armazenadas por muito tempo a 4°C ou em freezer, o crescimento foi inibido.

Tabela 6. Características das linhagens de *Ganoderma* do Brasil

No.	FUNGO	COR	APARÊNCIA	PIGMENTAÇÃO DAS HIFAS	CLAMIDÓSPOROS
SP417773	<i>G. subamboinense</i>	Branca	Felpuda	Amarela	Presente
SP417774	<i>G. gibbosum</i>	Branca	Felpuda	Castanho-escuro	Ausente
SPC466392	<i>G. gibbosum</i>	Branca	Felpuda	Castanho-escuro	Ausente
SPC466393	<i>G. gibbosum</i>	Branca	Felpuda	Castanho-escuro	Ausente
SP417796	<i>G. australe</i>	Branca	Felpuda	—	Ausente
SP417797	<i>G. multiplicatum</i>	Branca	Felpuda	Castanho-escuro	Ausente
SP417776	<i>G. gibbosum</i>	Branca	Felpuda	Canela	Ausente
SP417798	<i>G. gibbosum</i>	Branca	Felpuda	Canela	Ausente
SP417777	<i>G. gibbosum</i>	Branca	Felpuda	Castanho-claro	Ausente
SP417778	<i>G. multiplicatum</i>	Branca	Felpuda	Amarela	Ausente
SP417799	<i>G. gibbosum</i>	Branca	Felpuda	Amarela	Ausente

Tabela 6. Continuação.

No. CULTURA	FUNGO	COR	APARÊNCIA	PIGMENTAÇÃO DAS HIFAS	CLAMIDÓSPOROS
SP417794	<i>G. gibbosum</i>	Branca	Felpuda	-	Ausente
SP417795	<i>G. gibbosum</i>	Branca	Felpuda	-	Ausente
SP417782	<i>G. australe</i>	Branca	Felpuda	Castanho-claro	Ausente
SP417783	<i>G. australe</i>	Branca	Felpuda	Castanho-claro	Ausente
SP417784	<i>G. australe</i>	Branca	Felpuda	Castanho-claro	Ausente
SP417785	<i>G. australe</i>	Branca	Felpuda	Castanho-claro	Ausente
SP417791	<i>G. australe</i>	Branca	Radiada	Amarela	Ausente
SP417786	<i>G. australe</i>	Branca	Radiada	-	Ausente
SP417787	<i>G. australe</i>	Branca	Radiada	Castanho-claro	Ausente
SP417788	<i>G. australe</i>	Branca	Felpuda	Castanho-claro	Ausente
SP417789	<i>G. australe</i>	Branca	Felpuda	Castanho-claro	Ausente
SP417792	<i>G. australe</i>	Branca	Radiada	-	Ausente
SP417793	<i>G. australe</i>	Branca	Felpuda	—	Ausente
SP445969	<i>G. australe</i>	Branca	Felpuda	Amarela	Ausente
SP417780	<i>G. multiplicatum</i>	Branca	Felpuda	Castanho-escuro	Ausente
SP417781	<i>G. gibbosum</i>	Branca	Felpuda	Castanho-claro	Ausente
IBT- 4 -	<i>G. gibbosum</i>	Branca	Felpuda	Castanho-claro	Ausente

- = Ausente

Tabela 7. Características das linhagens de *Ganoderma* coletadas na Colômbia.

No. CULTURA	FUNGO	COR	APARÊNCIA	PIGMENTAÇÃO DAS HIFAS	CLAMIDÓSPOROS
CUVC60073	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	—	Ausente
CUVC60074	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	—	Ausente
CUVC60075	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	—	Ausente
CUVC60076	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	Amarela	Presente
CUVC60077	<i>G. multiplicatum</i>	Branca	Felpuda	—	Presente
CUVC60078	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	—	Ausente
CUVC60079	<i>Ganoderma</i> sp.	Branca	Felpuda	Amarela	Ausente

Tabela 7. Continuação.

No.	FUNGO	COR	APARÊNCIA	PIGMENTAÇÃO DAS HIFAS	CLAMIDÓSPOROS
CULTURA					
CUVC60080	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	–	Ausente
CUVC60081	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	–	Presente
CUVC60082	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	Amarela	Ausente
CUVC60083	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	Amarela	Ausente
CUVC60084	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	Amarela	Ausente
CUVC60085	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	Amarela	Ausente
CUVC60086	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	–	Ausente
CUVC60087	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	–	Ausente
CUVC60088	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	–	Ausente
CUVC60089	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	Amarela	Presente
CUVC60091	Complexo <i>G. parvulum</i>	Beje	Felpuda	–	Ausente
CUVC60093	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	–	Presente
CUVC60096	Complexo <i>G. parvulum</i>	Branca	Felpuda	Amarela	Ausente

- = Hifas hialinas

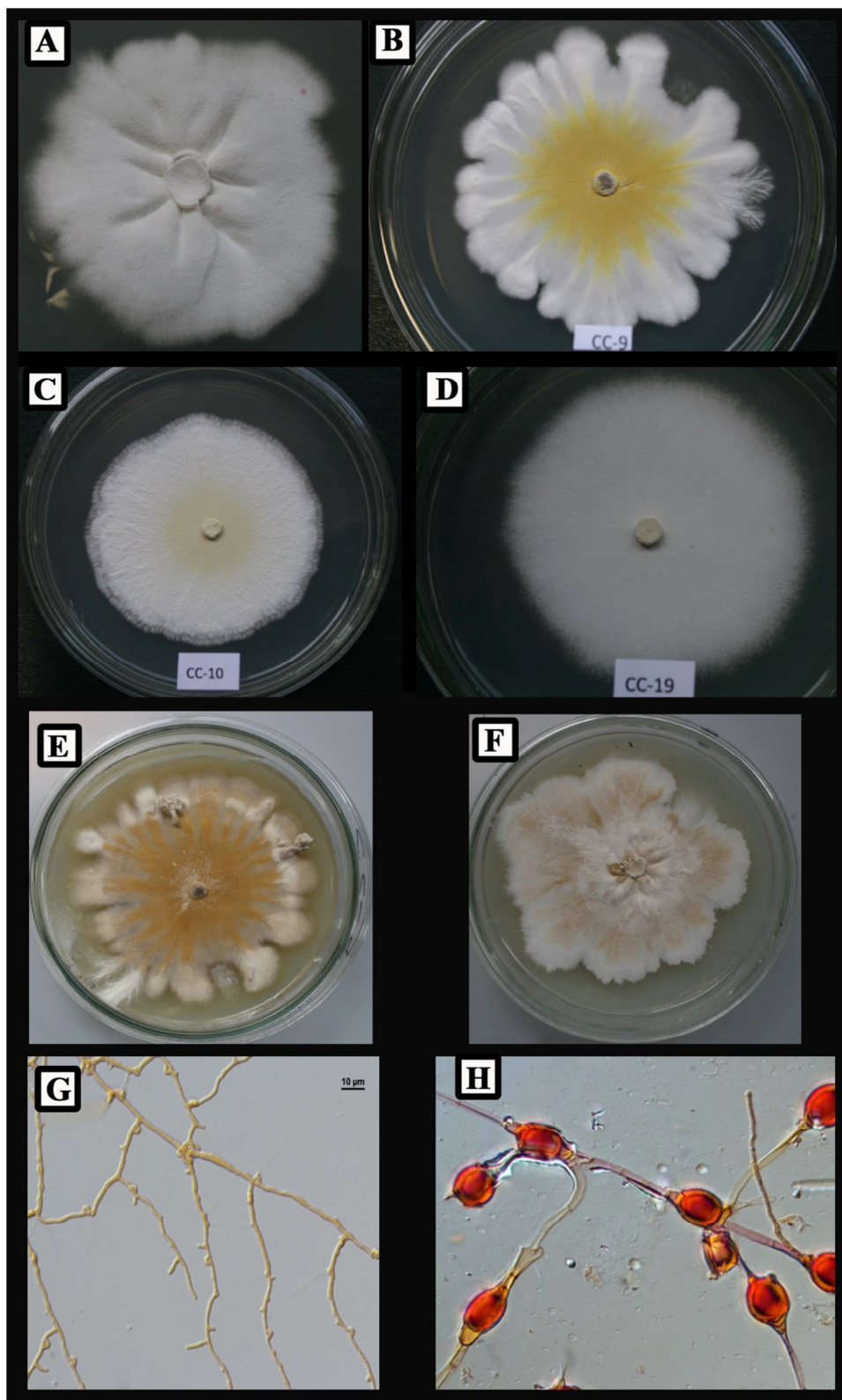


Figura 2. Características das colônias apresentadas por linhagens de *Ganoderma* em cultura, em meio extrato de malte. A). aparência radiada. B, C, D, F) aparência felpuda e coloração variada. E). Conglomerado de células. G). Hifas. H). Clamidósporos corados com floxina 1%.

4. 3. Análise de crescimento em extrato de malte (MEA)

A análise do crescimento das linhagens do gênero *Ganoderma* obtidas de árvores vivas como de tronco morto mostrou que em geral as linhagens que crescem em árvores vivas apresentam crescimento mais rápido do que as de tronco morto, uma vez que nos em 8 dias conseguem colonizar toda a placa-de-petri. Dentro das linhagens que crescem em árvores vivas há três grupos de crescimento: crescimento rápido, médio e lento. Crescimento rápido foi definido como aquele onde toda a placa-de-Petri é colonizada em 7 dias e atinge 8 cm de diâmetro; crescimento médio aquele onde a linhagem coloniza 5-7 cm e crescimento lento é aquele que a la linhagem coloniza até 4cm em 7 dias. Em árvores vivas no Brasil, *Ganoderma gibbosum* apresentou linhagens de crescimento rápido (SPC-2, SPC-7, SPC-10) e crescimento lento (UB-2). As duas linhagens de *G. multiplicatum* (SPC-5 e SPC- 9) encontradas em árvores vivas apresentaram crescimento lento. Em árvores vivas da Colômbia a linhagem CC-12 do complexo *G. parvulum* foi a de maior crescimento (Figura 3).

A grande maioria das linhagens que crescem em tronco morto apresentam crescimento lento. Uma linhagem de *G. gibbosum* (CTRA-8) foi a de maior crescimento. As linhagens de *G. australe* tiveram o crescimento mais lento de todas (IBT-1, CTRA-2, CTRA-3, CTRA-7, CTRA-4, CTRA-5, CTRA-1, CTRA-10). Uma linhagem de *G. multiplicatum* (IBT-2) apresentou crescimento médio (Figura 3). A taxa de crescimento tem sido um parâmetro usado na comparação de culturas de *Ganoderma* (Nobles, 1948, Adaskave & Gilbertson 1986, 1989). Segundo Moncalvo *et al.* (1995b) as culturas de crescimento rápido são termofílicas e produzem clamidósporos, enquanto que as de crescimento lento não são termofílicas e não produzem clamidósporos.

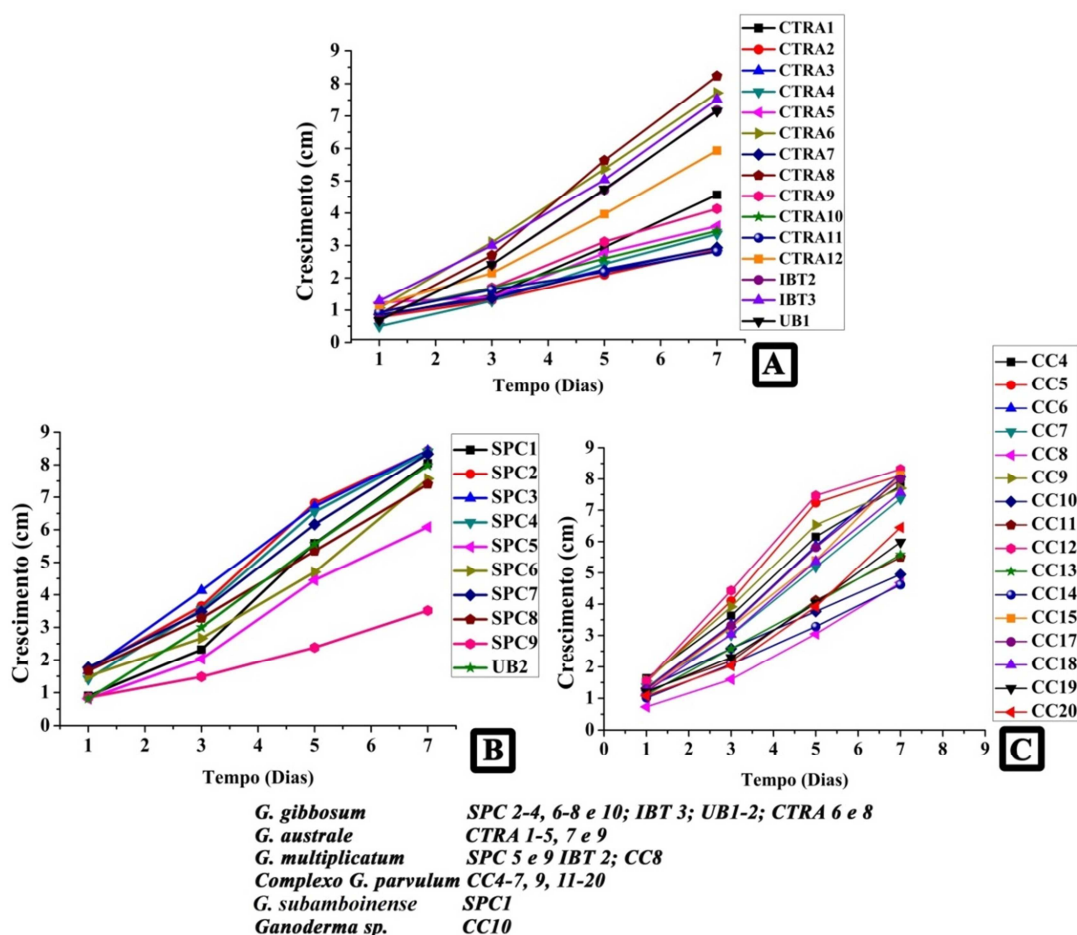


Figura 3. Crescimento em meio de cultura MEA. A). Linhagens de árvores mortas no Brasil. B). Linhagens de árvores vivas no Brasil. C). Linhagens de árvores vivas na Colômbia.

Nos resultados observados há linhagens de crescimento rápido e formação de clamidósporos, assim como também nenhuma das linhagens de espécies lacadas tiveram crescimento lento e várias não formaram clamidósporos.

A análise estatística foi feita no programa SAS; os dados foram tratados através da análise ANOVA de medidas repetidas, a qual verificou que há diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens, o tempo e a interação linhagem-tempo ($p < 0,05$).

4.4. Análise qualitativa de enzimas

A produção do sistema degradativo ligninolítico foi observado nos testes com RBBR; para lacases com guaiacol e as oxidases e peroxidases com o teste de gotas (figura 4).

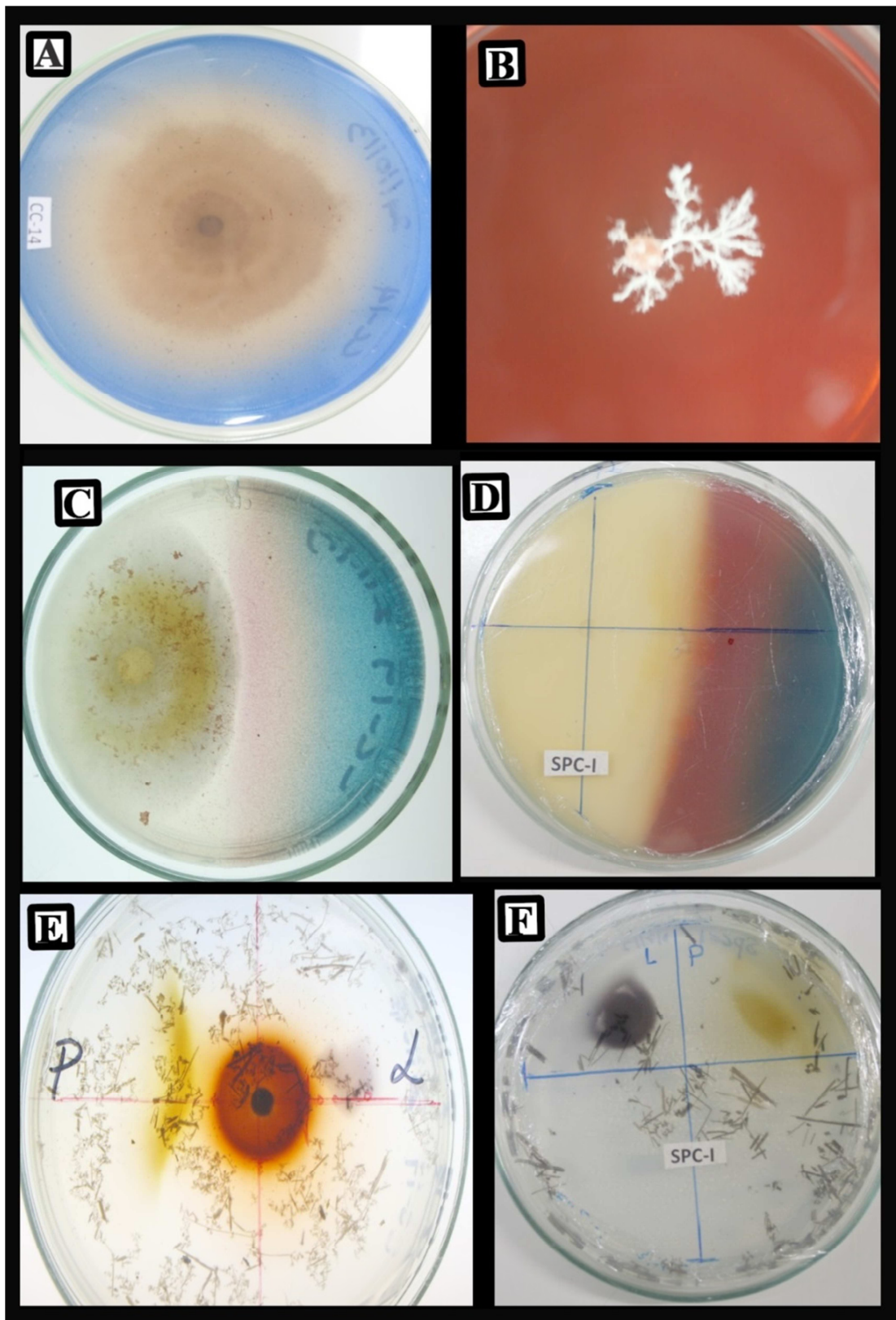


Figura 4. A). crescimento e halo de descoloração em meio RBBR. B). Crescimento rizomórfico em Celulose. C e D). Crescimento e descoloração no meio CAS. E). Formação de Halo e Reação + a lacase e peroxidase. F). Reação + a lacase e peroxidase.

O corante modelo azul brilhante de remazol R, muito usado na indústria têxtil e originário de antraceno, é um composto sintético tóxico que permite visualizar a atuação não específica do complexo enzimático e não enzimático lignolítico. Observou-se que espécimes de árvores mortas e árvores vivas são capazes de descolorir o corante junto com o seu crescimento. Em alguns casos (19%), a descoloração foi maior que o crescimento do fungo mostrando a presença de enzimas extracelulares (figura 5).

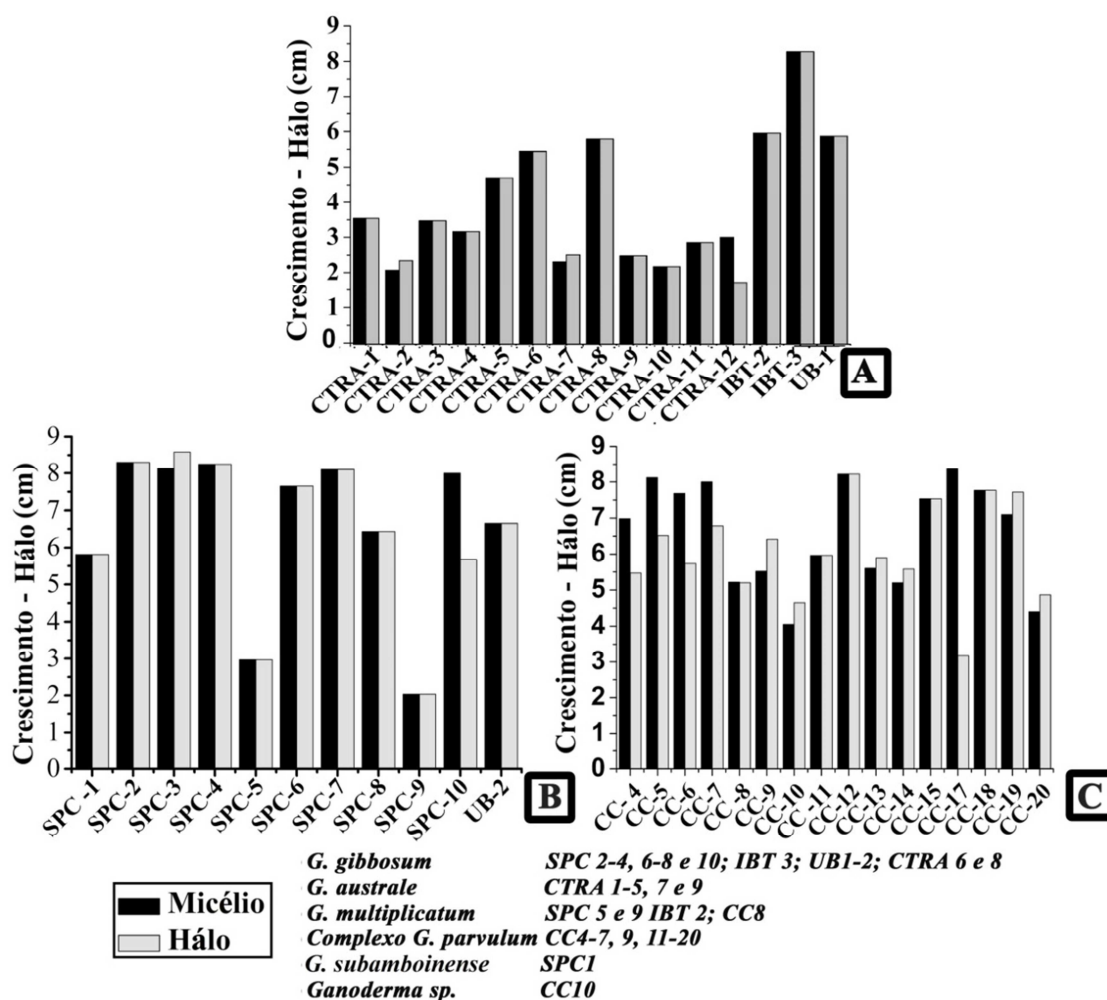


Figura 5. Crescimento e formação de halo em meio RBBR. A. Linhagens de *Ganoderma* presentes em árvores mortas. B. linhagens de *Ganoderma* presentes em árvores vivas no Brasil. C. Linhagens de *Ganoderma* presentes em árvores vivas na Colômbia.

Houve diferenças quanto à tonalidade da descoloração, algumas linhagens ficaram mais alaranjadas e outras tornaram o meio mais transparente.

Produção da enzima lacase em meio guaiacol foi detectada na maioria dos isolados (Figura 6), apenas o isolado de *G. subamboinense* (SPC 1) não formou halo e CTRA 6 não cresceu. Nos testes de gotas realizados para avaliar a produção de oxidases e peroxidases, nesse mesmo meio, os resultados foram positivos, inclusive para SPC 1 que não formou halo em guaiacol, entretanto, os isolados CTRA 9 e CTRA 10, que apesar de reagirem com o guaiacol não apresentaram reação a α -naftol nem a pirogalol (Tabela 8).

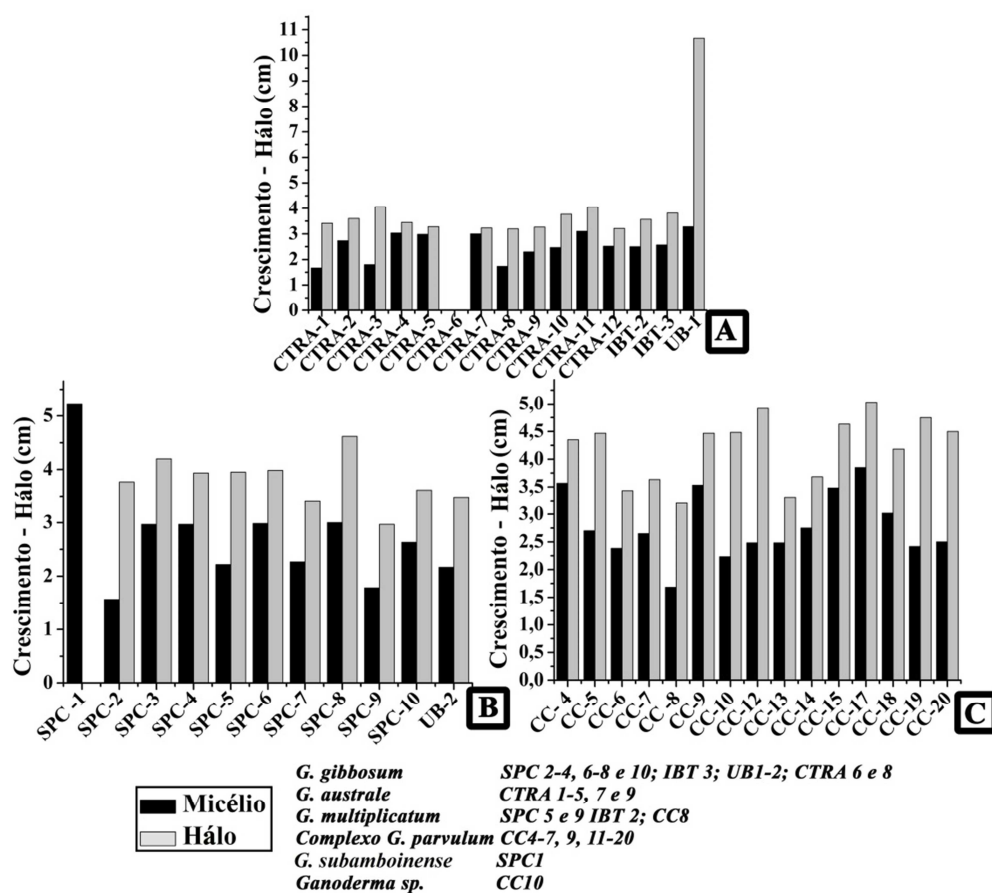


Figure 6. Crescimento e formação de halo no meio Guaiacol. A). Linhagens de *Ganoderma* presentes em árvores mortas. B). linhagens de *Ganoderma* presentes em árvores vivas no Brasil. C). Linhagens de *Ganoderma* presentes em árvores vivas na Colômbia.

É interessante notar que houve uma tendência na produção de celulases e compostos quelantes de ferro em relação ao substrato em que foram isolados. A atividade de celulase foi observada em 42,9% dos isolados (Figura 7), sendo que destes, 61,1% encontraram-se nos

isolados de árvores mortas, indicando necessidade diferenciada para colonizar o mesmo substrato em condições distintas (vivo ou em decomposição), permitindo supor estar ligada a disponibilidade de açúcares. Só duas linhagens de árvores vivas da Colômbia formaram halo no meio com celulose, indicando baixa produção de celulases.

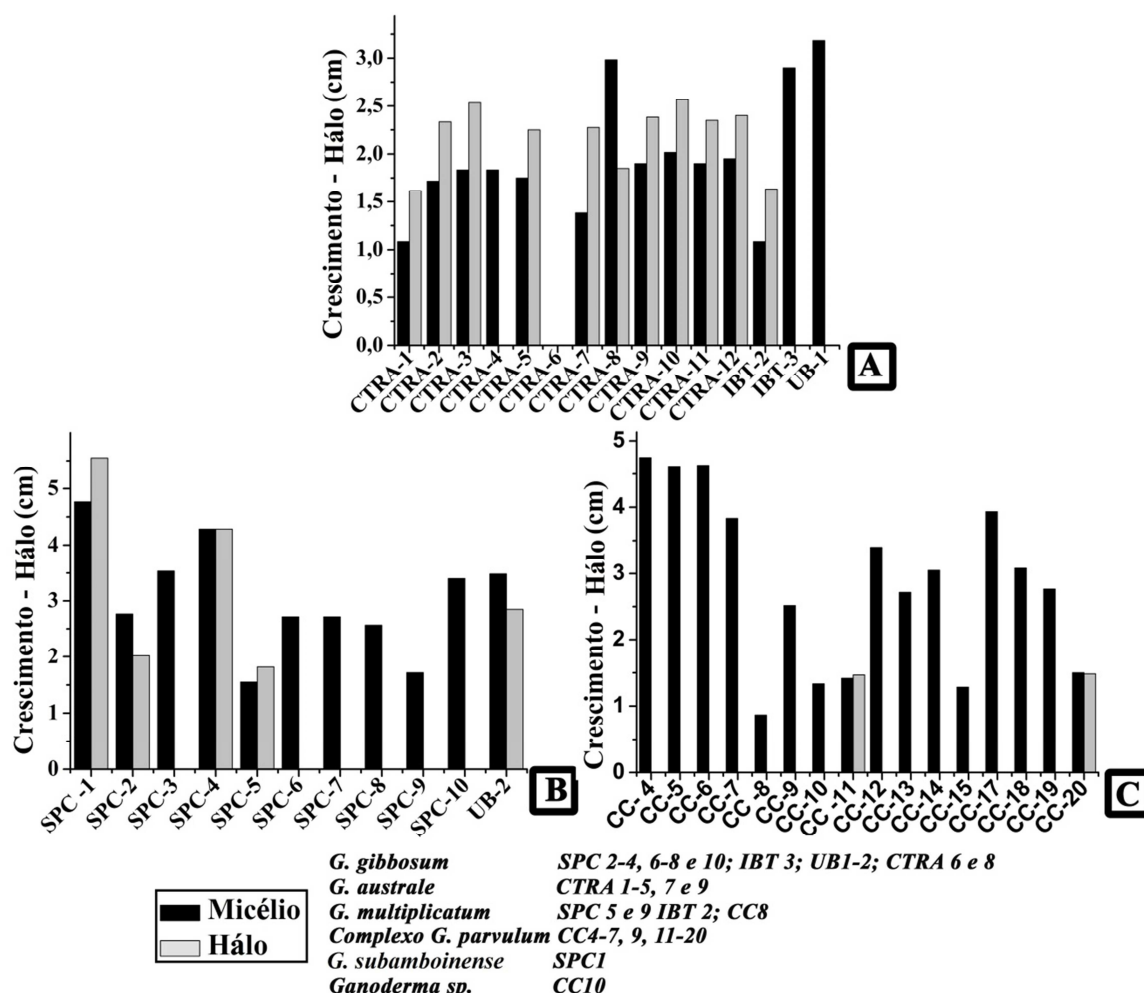


Figura 7. Crescimento e halo formados no meio com celulose. A. Linhagens de *Ganoderma* presentes em árvores mortas. B. Linhagens de *Ganoderma* presentes em árvores vivas no Brasil. C. Linhagens de *Ganoderma* presentes em árvores vivas na Colômbia.

Quanto a atividade de quelantes de ferro foi positiva para 80,8% das linhagens principalmente nas árvores vivas e nos isolados da Colômbia (Figura 8). Os resultados obtidos corroboram com a teoria da degradação da madeira, que se inicia com a reação de

despolimerização da parede celular causada pelos compostos de baixa massa molar, capazes de se complexar com Fe^{3+} e reduzi-lo a Fe^{2+} . Liberados no ambiente, na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), reagem formando radicais hidroxilas pela reação tipo Fenton ($\text{OH}^\bullet$) (Goodell *et al.* 1997; Milagres *et al.*, 2002 Aguiar *et al.* 2006; Arantes *et al.* 2006,). Embasados nessa teoria pode-se supor a maior necessidade do fungo em produzir quelantes de ferro para se estabelecer em árvores vivas.

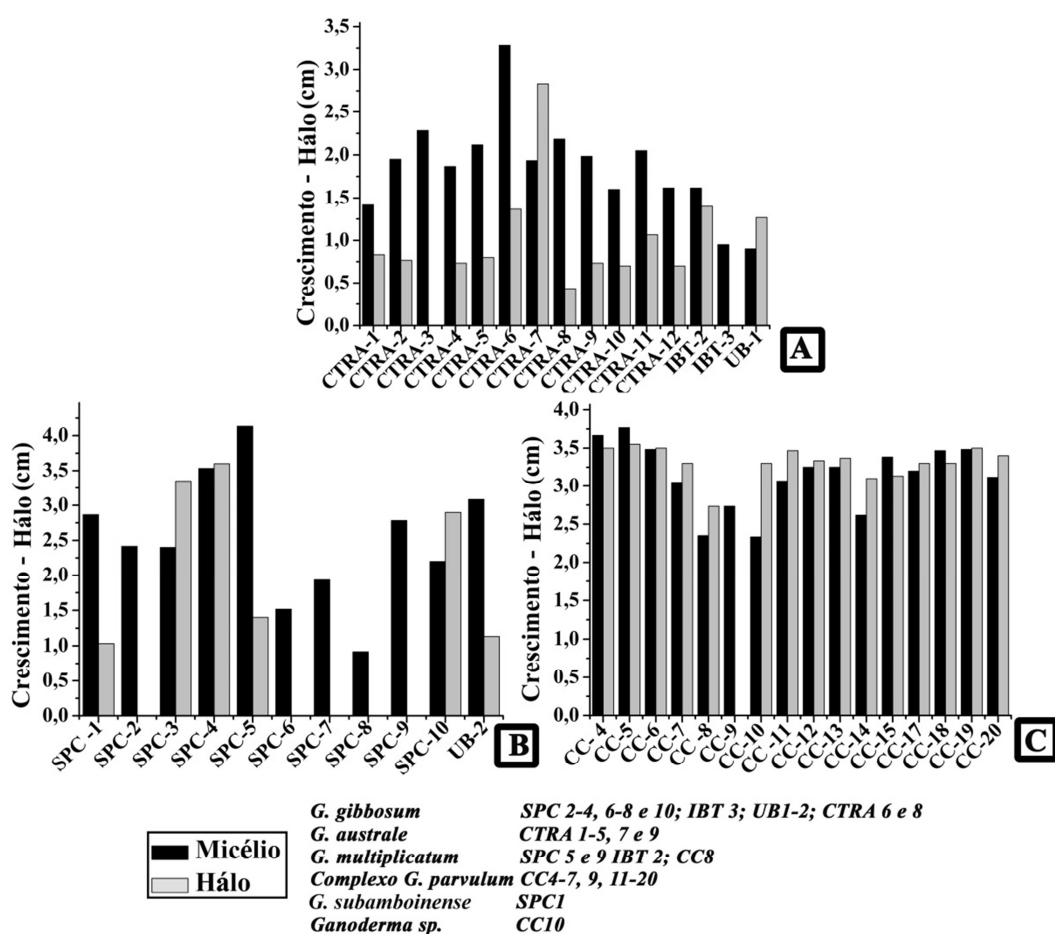


Figura 8. Crescimento e halo formados no meio CAS. A). Linhagens de *Ganoderma* presentes em árvores mortas. B). Linhagens de *Ganoderma* presentes em árvores vivas no Brasil. C). Linhagens de *Ganoderma* presentes em árvores vivas na Colômbia.

Tabela 8. Atividade lignocelulolítica de linhagens de *Ganoderma*. A. RBBR= Degradação do corante Rhemazol-Brilliant-Blue. CAS= Produção de sideróforos no meio cromo azurol S-CAS. LAC=Lacase. PER= Peroxidase. CEL=Celulase.

Espécimes	No Colector	No. Herbário	RBBR	CAS	LAC	PER	CEL
<i>G. australe</i>	CTRA-1	SP417782	+	+	+	+	+
	CTRA-2	SP417783	+	+	+	+	+
	CTRA-3	SP417784	+	—	—	+	+
	CTRA-4	SP417784	+	+	—	+	-
	CTRA-5	SP417791	+	+	—	+	+
	CTRA-7	SP417787	+	+	—	+	+
	CTRA-9	SP417789	+	+	—	—	—
	CTRA-10	SP417792	+	+	+	+	+
	CTRA-11	SP417796	+	+	—	+	+
	CTRA-12	SP417783	+	+	+	+	+
<i>G. gibbosum</i>	CTRA-6	SP417786	+	+	—	+	-
	CTRA-8	SP417788	+	+	—	+	+
	SPC-2	SP417774	+	—	—	+	+
	SPC-3	SP466392	+	+	—	+	+
	SPC-4	SP466393	+	+	—	+	+
	SPC-6	SP417776	+	-	+	+	+
	SPC-7	SP417798	+	—	—	+	+
	SPC-8	SP417777	+	—	—	+	+
	SPC-10	SP417799	+	+	+	+	+
	UB-1	SP417794	+	+	—	+	-
	UB-2	SP417795	+	+	—	+	+
	IBT-2	SP417780	+	+	—	+	+
<i>G. multiplicatum</i>	IBT-3	SP417781	+	—	—	+	-
	SPC-5	SP417796	+	+	+	+	+
	SPC-9	SP417778	+	—	—	+	-
	CC-8	CUVC60077	+	+	—	+	+
Complexo <i>G. parvulum</i>	CC-4	CUVC60073	+	+	+	+	+

Continuação Tabela 8

Espécie	No. Colector	No. Herbário	RBBR	CAS	LAC	PER	CEL
<i>Complexo G. parvulum</i>	CC-5	CUVC60074	+	+	+	+	-
	CC-6	CUVC60075	+	+	+	+	-
	CC-7	CUVC60076	+	+	+	+	-
	CC-9	CUVC60078	+	-	+	+	+
	CC-11	CUVC60080	+	+	+	+	-
	CC-12	CUVC60081	+	+	+	+	-
	CC-13	CUVC60082	+	+	+	+	-
	CC-14	CUVC60083	+	+	+	+	-
	CC-15	CUVC60084	+	+	+	+	-
	CC-16	CUVC60085	+	+	+	+	-
	CC-17	CUVC60086	+	+	+	+	-
	CC-18	CUVC60087	+	+	+	+	-
	CC-19	CUVC60088	+	+	+	+	+
	CC-20	CUVC60089	+	+	+	+	+
<i>G. subamboinense</i>	SPC-1	SP417773	+	+	-	+	+
<i>Ganoderma</i> sp. 1	CC-10	CUVC60079	+	+	+	+	+

+ = positivo, - = Negativo

4.5 Análise molecular

Do total de espécimes coletados (56), foi possível amplificar e sequenciar 48 espécimes para região ITS, 43 para a região LSU, 24 para a região SSU e 12 sequências para o gene da manganês peroxidase. Apesar de ter testado vários primers, vários protocolos de extração e Kitts, a amplificação da região SSU foi difícil e isto explica o baixo número de sequências obtidas. Hong & Jung (2002) mencionam que por este motivo a região SSU não tem sido muito usada na sistemática de fungos. O baixo número de sequências para o gene da manganês peroxidase deve-se a que só foram sequenciados 13 espécimes para constatar a presença deste gene. As Tabelas (9-12) apresentam o número de sequências obtidas por espécime. Estas sequências serão depositadas no Genbank.

Tabela 9. Espécimes, No de herbário e código genbank para as regiões ITS, LSU, SSU e MnP.

Espécie	No. Herbário	Código coletor	ITS	LSU	SSU	MnP
<i>G. subamboinense</i>	SP417773	SPC-1	KU569546	KU570945	KU695654	✓
<i>G. gibbosum</i>	SP417774	SPC-2	KU569547	KU570946	KU695655	✓
<i>G. gibbosum</i>	SP466392	SPC-3	KU569548			
<i>G. multiplicatum</i>	SP417796	SPC-5	KU569549	KU570947	KU695656	✓
<i>G. gibbosum</i>	SP417776	SPC-6	KU569550	KU570948		
<i>G. gibbosum</i>	SP417798	SPC-7	KU569551	KU570949		✓
<i>G. gibbosum</i>	SP417777	SPC-8	KU569552	KU570950		
<i>G. multiplicatum</i>	SP417778	SPC-9	KU569553	KU570951		✓
<i>G. gibbosum</i>	SP417799	SPC-10	KU569554	KU570952		
<i>G. gibbosum</i>	SP417794	UB-1	KU569556	KU570954		
<i>G. gibbosum</i>	SP417795	UB-2	KU569557	KU570955	KU695658	
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60072	CC-3	KU569510	KU570910		
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60073	CC-4	KU569511	KU570911		
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60074	CC-5	KU569512	KU570912	KU695635	
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60075	CC-6	KU569513	KU570913	KU695636	
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60076	CC-7	KU569514	KU570914	KU695637	
<i>G. multiplicatum</i>	CUVC60077	CC-8	KU569515	KU570915		
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60078	CC-9	KU569516	KU570916	KU695638	
<i>Ganoderma</i> sp. 1	CUVC60079	CC-10	KU569517	KU570917	KU695639	
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60080	CC-11	KU569518	KU570918	KU695640	
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60081	CC-12	KU569519	KU570919		✓
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60082	CC-13	KU569520	KU570920	KU695641	
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60083	CC-14	KU569521	KU570921	KU695642	
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60084	CC-15	KU569522	KU570922	KU695643	✓
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60085	CC-16	KU569523			✓
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60086	CC-17	KU569524	KU570923	KU695644	✓

Tabela 9. Continuação

Espécie	No. Herbário	Código coletor	ITS	LSU	SSU	MnP
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60087	CC-18	KU569525	KU570924	KU695645	✓
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60088	CC-19	KU569526	KU570925	KU695646	
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60089	CC-20	KU569527	KU570926	KU695647	
<i>Ganoderma</i> sp. 1	CUVC60090	CC-21	KU569528			
<i>Ganoderma gibbosum</i>	CUVC60092	CC-23	KU569529	KU570927		
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60093	CC-24	KU569530	KU570928	KU695648	
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60096	TP-3	KU569555		KU695657	
Complexo <i>G. parvulum</i>	CUVC60097	TP-4		KU570953		
<i>G. australe</i>	SP417782	CTRA1	KU569531	KU570929	KU695649	
<i>G. australe</i>	SP417783	CTRA2	KU569532	KU570930		
<i>G. australe</i>	SP417784	CTRA3	KU569533	KU570931		✓
<i>G. australe</i>	SP417784	CTRA4	KU569534	KU570932		
<i>G. australe</i>	SP417791	CTRA5		KU570933	KU695650	
<i>Ganoderma gibbosum</i>	SP417786	CTRA6	KU569535	KU570934	KU695651	
<i>G. australe</i>	SP417787	CTRA7	KU569536	KU570935		
<i>Ganoderma gibbosum</i>	SP417788	CTRA8	KU569537	KU570936		✓
<i>G. australe</i>	SP417789	CTRA9	KU569538	KU570937		
<i>G. australe</i>	SP417792	CTRA10	KU569539	KU570938		
<i>G. australe</i>	SP417796	CTRA11	KU569540	KU570939		✓
<i>G. australe</i>	SP417783	CTRA12	KU569541	KU570940		✓
<i>G. multiplicatum</i>	SP417780	IBT2	KU569542	KU570941	KU695652	✓
<i>Ganoderma gibbosum</i>	SP417781	IBT3	KU569543	KU570942		
<i>Ganoderma gibbosum</i>	-	IBT4	KU569544	KU570943		
<i>G. australe</i>	SP445969	RP57	KU569545	KU570944	KU695653	

✓ = Esperando código GenBank

Com base nos dados obtidos da análise qualitativa de enzimas e no teste de crescimento, realizou-se uma seleção das linhagens (13), para verificar a atividade enzimática em serragem de madeira de Sibipiruna (Capítulo 3).

Os resultados obtidos neste trabalho são apresentados nos seguintes capítulos:

Capítulo 1. Diversity of *Ganoderma* species occurring in leguminous plants and dead trees in two regions of the Neotropics, a phylogenetic and morfological approach. Contém análise filogenética e morfológica das sequências para os espécimes de *Ganoderma* encontrados. Este capítulo foi redigido sob normas da revista Phytotaxa.

Capítulo 2. New records of *Ganoderma multiplicatum* (Mont.) Pat. from Colômbia. Refere-se a primeira citação de *Ganoderma multiplicatum* para a Colômbia. Este capítulo é redigido sob normas da revista Check Lis The Journal of Biodiversity Data.

Capítulo 3. Ligninolytic enzymes activity in saprophyte and parasite species of *Ganoderma*. São apresentados os resultados do estudo enzimático quantitativo em espécimes saprófitas e parasitas de *Ganoderma* encontrados. Este capítulo foi redigido sob normas da revista Fungal Ecology.

Capítulo 4. Manganese peroxidase (MnP) gene in *Ganoderma* species. São apresentados os dados da detecção do gene da manganês peroxidase em 13 linhagens selecionadas de *Ganoderma*. Este capítulo foi redigido sob normas da revista Cryptogamie mycologye.

CAPÍTULO 1. Diversity of *Ganoderma* species occurring in leguminous plants and dead trees in two regions of the Neotropics, a phylogenetic and morphological approach.

BOLAÑOS, A.C.^{1,2}, BONONI, V.R.L.²; SUÁREZ-VILLOTA, E.Y.³; GUGLIOTTA, A.²;
MUÑOZ, J.E.⁴.

1. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Calle 13 # 100-00, Cali, Colombia
2. Instituto de Botânica, Núcleo de pesquisa em Micologia, Av. Miguel Stéfano, 3687. São Paulo Brasil.
3. Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas, Universidad Austral de Chile, Campus Isla Teja, Valdivia, Chile.
4. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Sede Palmira. Carrera 32 No. Palmira, Colombia.

Abstract:

Laccate and non-laccate specimens of *Ganoderma* have been observed with high frequency in legumes trees, used as ornamental plants in avenues and parks, and in rotten logs of preserved areas in Neotropical countries. To identify *Ganoderma* species, 31 specimens of *Ganoderma* were collected in São Paulo and Uberlandia, Brazil and in Cali, Colombia from legumes trees. Eighteen samples from rotten logs were also collected in Brazil and Colombia to comparative purpose. Morphological analyses through optical and electron scanning microscopy were carried out. Internal transcribed spacers (ITS), 25S ribosomal RNA (LSU), 18S ribosomal RNA (SSU) and manganese peroxidase (MnP) partial genes were amplified. Phylogenetic relationships were recovered with maximum parsimony, maximum likelihood, and Bayesian methods, using 140 additional sequences from GenBank. Non-laccate species were recovered as monophyletic clade highly supported (Bootstrap: 84%, BPP: 1.0), while laccate species were formed by eight polyphyletic highly supported clades. Seven samples from Brazil and Colombia were identified as *G. gibbosum* and 11 from Brazil as *G. australe* in morphological and phylogenetic analyses. The laccate samples were recovered in four well supported clades, where one specimen from Brazil was identified as *G. subamboinense* and three were identified as *G. multiplicatum*. Eighteen samples from Colombia were recovered together with *G. multipileum*, *G. parvulum*, *G. oerstedii*, and *G. tuberculosum* reference sequences in a monophyletic clade, nevertheless, morphological analyses locate these samples as *G. multipileum*. Two samples from Colombia recovered in a monophyletic clade could not be related to any reference sequence and its morphological characters were not enough to species discrimination. *G. australe* specimens were found exclusively in rotten logs, while *G.*

gibbosum and *G. multiplicatum* were found both leguminous tree and rotten logs. Thus, problems based in morphological characteristics, phylogenetic relationships and published reference sequences are documented suggesting deep taxonomic revision in *Ganoderma* genus. Finally, the association between fungi species and leguminous plants are discussed in the light of biochemical coevolution and ecological relationships in anthropic areas.

Key words: fungal phylogeny, Ganodermataceae, basidiospore ultrastructure, taxonomy

Introduction

The genus *Ganoderma* was created by Karsten (1881), to designate a species whose main morphological characteristic is to present a double wall basidiospore (Moncalvo & Ryvarden 1997). The high phenotypic plasticity observed in the basidiomata and uniformity in microscopic characters (Steyaert 1972, Ryvarden 1991) have led to the description of 290 names and a confused and chaotic taxonomy for the genus (Ryvarden 1991, 2000).

The *Ganoderma* genus is widespread around the world; many species have been reported in temperate zones (Gilbertson & Ryvarden 1986; Ryvarden & Gilbertson 1993) and tropical areas (Ryvarden & Johansen 1980; Zhao, 1989; Nuñez & Ryvarden 2000). For the Neotropics knowledge is incomplete yet, but there are calculations of about 20 species by Ryvarden (2004), and 28 species only for Brazil by Torres-Torres *et al.* (2012) and Gugliotta *et al.* (2013).

In Brazil, from a morphological point of view, several authors have reported laccate and non laccate species of *Ganoderma*, including species restricted to Europe as *G. lucidum* and *G. applanatum* (Patouillard, 1889, Torrend, 1920, Steyaert, 1962, 1980; Furtado, 1967; Fidalgo, 1968; Bononi *et al.* 1981, 2008; Rajchernberg & Meyer 1990, Loguercio-Leite & Wright 1991; Silva & Minter 1995; Gerber 1996; Gerber & Loguercio Leite 1997; Goes-Neto 1999, Ryvarden, 2000, 2004, Meijer 2001, 2003; Gilbertoni & Cavalcanti 2003; Goes-Neto *et al.* 2003; Groposo & Loguercio-Leite 2005; Loguercio-Leite *et al.* 2005; ; Torres-Torres & Guzman-Davalos 2005, 2012; Dreschesler-Santos *et al.* 2008, 2009; Torres-Torres *et al.* 2008; Baltazar & Gilbertoni, 2009; Gilbertoni & Drechsler-Santos 2010; Westphalem *et al.* 2010, Gomes-Silva & Gilbertoni 2011; Gomes-Silva *et al.* 2011; Gugliotta *et al.* 2011, Torres-Torres *et al.* 2012). Spore ornamentation by scanning electron microscopy and comparisons with isoenzyme made in Argentina by Gottlieb *et al.* (1998) and Glottieb & Wright (1999a, b) included Brazilian specimens. Recent research emerge day after day considering phylogenetic analysis as a more effective tool to acquire greater knowledge of the genus *Ganoderma* in the neotropics (Moncalvo *et al.* 1995a, Gottlieb *et al.* 2000, Moncalvo & Buchanan 2008, Nascimento *et al.* 2011; Lima *et al.* 2014).

In Colombia the genus *Ganoderma* has been less studied; however, based on morphological studies *G. adspersum* (Schulz.)Donk, *G. amazonense* Weir, *G. applanatum* (Pers.) Karst., *G. australe* (Fr.) Pat., *G. brownie* (Murr.) Gilb., *G. chaliceum* (Cooke) Stey, *G. concinnum* Ryvarden, *G. fornicatum* (Fr.) Pat., *G. lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst., *G. neurosporum* Furt., and *G. nitidum* Murr. (Ryvarden 2004, Vasco-Palacios & Franco-Molano, 2013) have

been mentioned. The aim of this study was to identify the species of *Ganoderma* frequent in dead stumps of natural reserves and ornamental leguminous in some cities of Brazil and Colombia, through morphological, basidiospore ultrastructure and phylogenetic analysis. In this analysis we used sequences of internal transcribed spacers (ITS) and 25S ribosomal RNA (LSU) and reference sequence download of the Genbank. Some additional references of 18S ribosomal RNA (SSU) and manganese peroxidase gene (MnP) were also used to support specific relationships.

Material and Methods

Fungal specimens

Basidiomata of *Ganoderma* species were collected in affected living leguminous and rotten logs in urban and protected areas in Brazil and Colombia. The specimens were placed in paper bags, previously marked and transported to the laboratory to study morphological macroscopic and microscopic characters, isolation and conservation on Malt extract agar (MEA) 2%. The material collected was subjected to drying in an oven at 50 ° C for one week, frozen for over a week and placed in paper bags wrapped in plastic (Fidalgo & Bononi 1984). Finally, specimens were included in the herbarium (SP) of the Botanical Institute in São Paulo and (CUVC) herbarium of Universidad del Valle in Colombia. The information of each specimen is in table 1.

Table 1. *Ganoderma* specimens collected in leguminous trees and dead stump

Species	Origen	Collection No	Host
<i>G. australe</i> (Fr.) Pat.	Brazil/ São Paulo	SP417782 (CTRA-1)	Dead stump
		SP417783 (CTRA-2)	"
		SP417784 (CTRA-3)	"
		SP417785 (CTRA-4)	"
		SP417791 (CTRA-5)	"
		SP417787 (CTRA-7)	"
		SP417789 (CTRA-9)	"
		SP417792 (CTRA-10)	"
		SP417796 (CTRA-11)	"
		SP417793 (CTRA-12)	"
		SP445969 (RP-57)	"
<i>G. gibbosum</i> (Blume & T. Nees) Pat.	Brazil/ São Paulo	SP417774 (SPC-2)	<i>Inga vera</i> Willd
		SP417775 (SPC-3)	<i>Caesalpinia ferrea</i> C. Mart.
		SP417776 (SPC-6)	<i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth.
		SP417798 (SPC-7)	"
		SP417799 (SPC-10)	"
		SP417795 (UB-2)	"
		SP417777 (SPC-8)	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit
	Brazil/ São Paulo	SP417794 (UB-1)	Dead stump
		SP417781 (IBT-3)	"
		SP - (IBT-4)	"
		SP417786 (CTRA-6)	"
	Colombia/Cali	SP417788 (CTRA-8)	"
		CUVC692(CC-23)	<i>Inga edulis</i> Marth.
<i>G. multiplicatum</i> (Mont.) Pat.	Brazil/São Paulo	SP417778 (SPC-9)	<i>Tipuana tipu</i> (Benth.) O. Kuntze
		SP417797 (SPC-5)	<i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth.
		SP417780 (IBT-2)	Dead stump
	Colombia/Cali	CUVC 294(CC-8)	<i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth.

Table 1. Continue....

Species	Origen	Collection No	Host
<i>G. parvulum complex</i>	Colombia/Cali	CUVC 672(CC-3)	<i>Cassia fistula</i> L.
		CUVC 673(CC-4)	
		CUVC 674(CC-5)	
		CUVC 675(CC-6)	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit
		CUVC 676(CC-7)	<i>Cassia fistula</i> L.
		CUVC 678(CC-9)	<i>Cassia fistula</i> L.
		CUVC 680(CC-11)	<i>Cassia fistula</i> L.
		CUVC 683(CC-14)	<i>Cassia fistula</i> L.
		CUVC 684(CC-15)	<i>Cassia fistula</i> L.
		CUVC 685(CC-16)	<i>Cassia fistula</i> L.
		CUVC 686(CC-17)	<i>Cassia fistula</i> L.
		CUVC 681(CC-12)	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit
		CUVC 682(CC-13)	"
		CUVC 697(CC-18)	<i>Phitecelobium dulce</i> (Roxb.) Benth.
		CUVC 698(CC-19)	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit
		CUVC 689(CC-20)	<i>Cassia siamea</i> Lam.
		CUVC 693(CC-24)	<i>Bauhinia purpurea</i> (L.) Benth.
		CUVC 696(TP-3)	<i>Bauhinia purpurea</i> (L.) Benth.
<i>Ganoderma</i> sp.	Colombia/Cali	CUVC 679(CC-10)	<i>Cassia fistula</i> L.
		CUVC 690(CC-21)	<i>Delonix regia</i> (Bojer ex Hook.) Raf.
<i>G. subamboinense</i> (P.Henn.) Bazz. & Wright	Brazil/ São Paulo	SP417773(SPC-1)	<i>Caesalpinia ferrea</i> C. Mart.

Morphological studies

For the study of macro and microscopic characteristics thin sections of basidioma were prepared and treated with 4% KOH, 1% Phloxine and Melzer reagent. The total characteristics observed were identified in accordance with Gilbertson & Ryvarden (1986), Ryvarden (2000, 2004), Gugliotta *et al.* (2011), Torres-Torres & Guzman-Dávalos (2012). Images were captured with a Nikon digital camera, DS-U3 Ri1 model; software nis elements Br. Twenty basidiospores were measured from each specimen of *Ganoderma* collected.

Ultrastructural studies

Spores of *Ganoderma* species were filtered through 0.25 mm sieve, stored in Eppendorf® tubes with 70% ethanol. After sonication and centrifugation for 5 minutes respectively, one drop of each tube was removed, placed in metal support and brought to desiccator chamber for 12 hours. Prior to observation under scanning electron microscope (Jeol JSM6490LV) a gold bath was done during five minutes in each sample (Gottlieb & Wright 1999a, b).

DNA isolation, PCR amplification and sequencing

DNA was extracted from the mycelium and basidioma fragment removed before drying and stored on silica gel. The DNA extraction was performed according to protocols cited by Raeder & Broda (1985), Moncalvo *et al.* (1995a), Gottlieb *et al.* (2000), and Nascimento *et al.* (2011). Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a thermal cycler C1000 Touch™ Thermal Cycler Bio-Rad. For ITS region amplification the primers set BMB-CR (5'-GTACACACCGCCCGTCG-3') and LRI (5'-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3') were used under conditions described by Vilgalys & Hester (1990). Primers LROR (3'-

ACCCGCTGAACTTAAGC-5') and LR7 (3'TACTACCACCAAGATCT-5') under conditions described by White *et al.* (1990) and Korbie & Mattick (2008) were used to amplified LSU region. SSU region amplification was carried out with Primers BMS05 (5'-TTAATTTTGGTTCNGATTGAACG-3') and BMS173 (5'TGCTATGACTTTTGAGATGTTAC-3') under conditions of Hong & Jung (2004). For MnP gene amplification primers E2FB (5'-GAC CTS CAG AAG AAC CTG TTC SA-3') and E8R (5'CGG AGY TGS GTC TCG ATG AAG-3') reported by and Isikhuemhen et al. (2002) under conditions described by Vilgalys & Hester (1990) were used. Purification of PCR products and nucleotide sequencing were conducted by MacroGen Inc. The partial sequences of the regions ITS, LSU, SSU and MnP were assembled and edited with Chromas PRO version 2.1 program and submitted to Genbank under accession numbers (Provided upon acceptance).

Phylogenetic analyses

Published reference sequences were downloading from GenBank prioritizing South America specimens and those specimens with largest nucleotide sequences for our selected genes (Table 2). These reference sequences together with our sequences were aligned using MAFFT, version 5 (Kato et al. 2005) under the interactive method of global pairwise alignment (G-INSi). By using each single gene sequence matrix and concatenated gene datasets, phylogenetic reconstructions using maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML), and Bayesian inference (MCMC) were conducted. MP PAUP* 4.0 v.b.10 (Swofford, 2001) was used, all characters were treated as equally-weighted using a heuristic search with tree bisection reconnection (TBR), branchswapping option, steepest descent off and MULTREES option on, and 1000 random-taxon addition sequences to search for optimal trees. Support for nodes in MP analyses was assessed using non-parametric bootstrapping with 10,000 full heuristic pseudo-replicates.

For ML and MCMC analyses, the best-fit partitioning schemes and models of nucleotide substitution were selected using Bayesian Information Criterion (BIC), implemented in PartitionFinder, version 1.1.0 (Lanfear *et al.* 2012). ML analyses were performed using GARLI, version 2.0 (Bazinet *et al.* 2014). To ensure the convergence of topologies, three likelihood analyses were performed. Statistical support for the nodes was estimated by the nonparametric bootstrap (Felsenstein 1985), with 1000 pseudoreplicates. Bayesian analysis was performed using MrBayes 3.04b (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Markov chains were started from a random tree and run for 1.0×10^7 generations, sampling every 1000th generation. The stationary phase was checked following Nylander *et al.* (2004) using Tracer version 1.6 (Rambaut *et al.* 2014). Sample points prior to the plateau phase were discarded as burn-in, and the remaining trees were combined to find the maximum a posteriori probability estimated of the phylogeny.

Results

For this analysis, a total of 478 sequences of the ITS (272), LSU (111), SSU (81) and MnP (14), regions were used, being that 128 sequences were generated from the especimes collected and six sequences correspond to the outgroup (Figure 1).

According to Maximum parsimony (MP) analyses, 3816 of these characters are constant, 270 are uninformative and 474 are parsimony informative. The most parsimonious trees had a length of 1379, a consistency index of 0.6563 and 0.8775 of retention index. The best fit models were HKY+I+G (for 18S and SSU), HKY+G (ITS1, ITS2 and MnP), K80 (5.8S and 25S), K81+I+G (for LSU) and HKY+G (for MnP). The best fit partitioning scheme for concatenate analysis separated MnP, 5.8S and 25S sequences in a different data block totalizing six partitions. To facilitate analysis we only discuss the clades where our samples were recovered.

In this analysis the ITS, LSU and concatenated trees have similar topology (annexed. 1, 2), the only topological disagreement was restricted to low support branches.

The analysis performed allowed to recognize monophyletic clade with high support (100/99/1.0), for the non-lacquered species of *Ganoderma* (Fig. 1 Clade A) and well-supported polyphyletic clades for the lacquered species (Fig. 1, Clade B-I).

Non-lacquered species are organized in three monophyletic highly supported subgroups (Fig. 1, Clade A). The subgroup 1, is conformed by the Brazilian samples from dead trunks collected in protected areas and the reference sequences of *G. australe* (Fr.) Pat., *G. lobatum* (Schw.) ATK., *G. tornatum* (Pers.) Bres., native from Australia and South America (Fig. 1). The second subgroup is conformed by reference sequences of *G. applanatum* (Pers.) Pat., native from Japan and England, and one sample of *G. lobatum*, native from USA. The third subgroup is conformed by the reference sequences of *G. australe* and *G. gibbosum*, originating from Taiwan and China, and from the individual sequences collected of dead trees and leguminous plants (Fig. 1, Table 2).

Two lacquered samples from Colombia were recovered as a high support phylogenetic clade, suggesting that they are the same species (CC-10 and CC-21; Fig. 1 Clade D). These samples were recovered with *G. chaliceum* (Cooke) Stey., reference sequences as a poorly supported clade in ITS and concatenated trees (Fig. 1, annexed 1).

In the Clade E, eighteen sequences of lacquered species collected in living trees native from Colombia were recovered in one monophyletic clade. These samples are related with a high support subclade, represented by *G. multipileum* Ding Hou., native from Asia and one second non supported clade, conformed by reference sequences of *G. parvulum* Murr., from Brazil and *G. oerstedii* (Fr.) Murr. and *G. tuberosum* Murr. from Argentina.

In the Clade F, one sample from living tree originated in Colombia, two samples of Brazilian living trees and one sample of dead stump are related with the reference sequence of *G.*

multiplicatum (Mont.) Pat, in one monophyletic clade highly supported (Fig. 1). This is the first time that *G. multiplicatum* is cited from Colombia.

The Clade H is a monophyletic clade conformed by one sample collected from a Brazilian living tree, highly related with *G. subamboinense* (Henn.) var. *laevisporum* Bazzalo & Wright, from Argentina. In this clade, it was also grouped references sequences from the species *G. sessile* from Argentina and USA, *G. resinaceum* from Europe, USA and Argentina, and *G. weberianum* (Bres. & Henn.) Stey. from Asia.

The ultrastructure analysis of the spore wall revealed that non-lacquered species presents only one ornamentation pattern with longitudinal cavities. The lacquered species present two ornamentation patterns of the spore wall, one rough and the other one with perforate or spaced depressions of the surface (Figures 2-7).

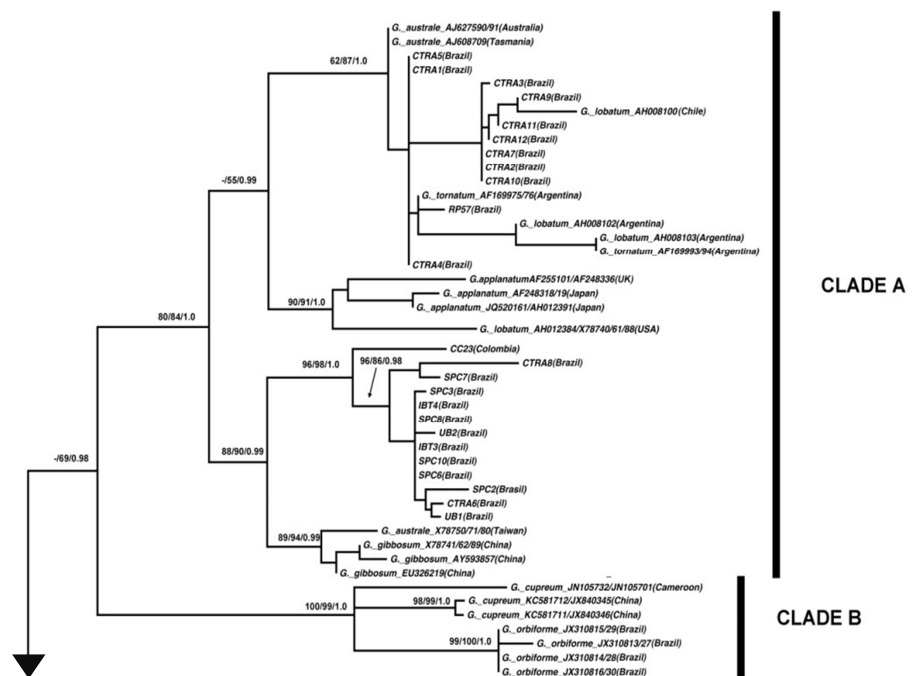


Figure 1. Concatenate tree and reconstruction of the phylogenetic history of the sequences of *Ganoderma* species. Statistical support nodes include the maximum parsimony bootstrap, maximum likelihood and Bayesian respectively.

[illegible]

Table 2. Sequences of *Ganoderma*, origin and references used.

Species	Herbarium Number	Origin	ITS	LSU	SSU	MnP	Reference
<i>G. applanatum</i>	CBS175.30	Inglaterra	AF255101	-	AF248336	-	Moncalvo & Buchanan 2008; Hong & Jung 2004
<i>G. applanatum</i>	KCTC6474	Japan	-	-	AF248318	-	Hong & Jung 2004
<i>G. applanatum</i>	KCTC 6474	Japan	-	-	AF248319	-	Hong & Jung 2004
<i>G. applanatum</i>	ATCC 44053	Japan	JQ520161	-	AH012391	-	Park <i>et al.</i> 2012; Hong & Jung 2004
<i>G. australe</i>	3795	Tasmania	AJ608709	-	-	-	Glen <i>et al.</i> 2009
<i>G. australe</i>	UWA 108	Australia	AJ627590 /AJ627591	-	-	-	Smith & Sivasithamparam 2000
<i>G. australe</i>	RSH0705	Taiwán	X78750/X78771	X78780	-	-	Moncalvo <i>et al.</i> 1995a
<i>G. cupreum</i>	HMAS99399	China	JX840346	-	KC581711	-	Wang <i>et al.</i> 2014
<i>G. cupreum</i>	HMAS130804	China	JX840345	KC581712	-	-	Wang <i>et al.</i> 2014
<i>G. cupreum</i>	GanoTK4	Cameroon	JN105701	-	JN105732	-	Wang <i>et al.</i> 2014
<i>G. chaliceum</i>	URM80457	Brazil	JX310812	JX310826	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>G. gibbosum</i>	ACCC 5.151	China	X78741/X7762	X78789	-	-	Moncalvo <i>et al.</i> 1995a
<i>G. gibbosum</i>	AS5.624	China	AY593857	-	-	-	Wang & Yao 2005
<i>G. lobatum</i>	BAFC651	Chile	AH008100	-	-	-	Gottlieb <i>et al.</i> 2000
<i>G. lobatum</i>	BAFC2454	Argentina	AH008102	-	-	-	Gottlieb <i>et al.</i> 2000
<i>G. lobatum</i>	BAFC2411	Argentina	AH008103	-	-	-	Gottlieb <i>et al.</i> 2000
<i>G. lobatum</i>	CBS 222.48	USA	X78740/X78761	X78788	AH012384	-	Moncalvo <i>et al.</i> 1995a; Hong & Jung 2004
<i>G. linghzi</i>	WU1006-38	China	JQ781858	-	JX029989	-	Cao <i>et al.</i> 2012
<i>G. linghzi</i>	CUI9166/ DAI12479	China	JQ781864	-	JX029988	-	Zhou <i>et al.</i> 2014; Cao <i>et al.</i> 2012
<i>G. linghzi (as tsugae)</i>	RSH BCL	Taiwan	Z37097/37078	Z37028	-	-	Moncalvo <i>et al.</i> 1995b
<i>G. linghzi (as tsugae)</i>	RSH J2	Japan	X78746/X78767	X78778	-	-	Moncalvo <i>et al.</i> 1995b
<i>G. linghzi</i>	DAI12479/ CUI9166	China	JQ781864	-	JX029987	-	Zhou <i>et al.</i> 2014; Cao <i>et al.</i> 2012
<i>G. linghzi(as ludicum)</i>	HMAS 60537	China	Z37050/Z37074	Z37023	-	-	Moncalvo <i>et al.</i> 1995b
<i>G. lucidum</i>	ATCC46755	Canadá	JQ520185	-	AF214468	-	Park <i>et al.</i> 2012; Hong & Jung 2004
<i>G. lucidum</i>	CBS 176.30	UK	AF094511 /AF044490	-	AF248325	-	Park <i>et al.</i> 2012; Hong & Jung 2004
<i>G. lucidum</i>	IMSNU32114/ SBS270.81	France	Z37049	Z37099 /AF21467	-	-	Moncalvo <i>et al.</i> 1995b; Hong <i>et al.</i> 2002
<i>G. lucidum</i>	DAI 11593	Finland	JQ781852	-	-	-	Cao <i>et al.</i> 2012
<i>G. lucidum</i>	Rivoire 4195	France	KJ143909	-	-	-	Zhou <i>et al.</i> 2014
<i>G. lucidum</i>	HMAS86597	UK	AY884176	-	-	-	-
<i>G. lucidum</i>	BAFC2419	Argentina	AF170007	-	-	-	Gottlieb <i>et al.</i> 2000
<i>G. lucidum</i>	BAFC2493	Argentina	AF170009	-	-	-	Gottlieb <i>et al.</i> 2000
<i>G. lucidum</i>	260125-1 Genome	China	JH7111526	JH7111526	-	-	Cheng <i>et al.</i> 2012
<i>G. meredithiae</i>	KCTC6284	USA	JQ520190	-	AF248343	-	Park <i>et al.</i> 2012; Hong & Jung 2004
<i>G. meredithiae</i>	IMSNU32115	USA	-	-	AF248344	-	Hong & Jung 2004
<i>G. meredithiae</i>	CGMCC 5.766Genome	USA	KP410262	KP410262	KP410262	-	Wang <i>et al.</i> 2015
<i>G. multipileum(as lucidum)</i>	SH ATCC 32472	India	X87351/X87361	-	-	-	Hseu <i>et al.</i> 1996
<i>G. multipileum (as lucidum)</i>	JMM P93-1	Philippines	X78745/66	-	-	-	Moncalvo <i>et al.</i> 1995a
<i>G. multipileum</i>	BCRC36123	india	EU021459	-	-	-	Wang <i>et al.</i> 2009
<i>G. multipileum</i>	BCRC 37043	Taiwan	EU021460	-	-	-	Wang <i>et al.</i> 2009
<i>G. multipileum</i>	CWN01740	Taiwan	EU021461	-	-	-	Wang <i>et al.</i> 2009
<i>G. multipileum</i>	BCRC37033	Taiwan	EU021462	-	-	-	Wang <i>et al.</i> 2009
<i>G. multipileum</i>	Dai 9447	China	KJ143914	-	KF494984	-	Zhou <i>et al.</i> 2014
<i>G. multiplicatum</i>	URM83346	Brazil	JX310823	JX310837	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>G. orbiforme</i>	URM83335	Brazil	JX310815	Jx310829	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>G. orbiforme</i>	URM83336	Brazil	JX310816	JX310830	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>G. orbiforme</i>	URM83334	Brazil	JX310814	JX310828	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>G. orbiforme</i>	URM83332	Brazil	JX310813	JX310827	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>G. parvulum</i>	URM80765	Brazil	JX310822	JX310836	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>G. parvulum</i>	URM2948	Brasil	JX310821	JX310835	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>G. parvulum</i>	URM83345	Brasil	JX310820	JX310834	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>G. parvulum</i>	URM83344	Brasil	JX310819	JX310833	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>G. parvulum</i>	URM83343	Brasil	JX310810	JX310846	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>G. parvulum</i>	URM83340	Brasil	JX310818	JX310822	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>G. parvulum</i>	URM83339	Brasil	JX310817	JX310831	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>G. oerstedii</i>	KCTC6286	Argentina	Z37034/Z37059	Z37084	AF214469	-	Moncalvo <i>et al.</i> 1995b
<i>G. resinaceum</i>	IMSNU32119/CBS52036	USA	JQ520201	AF248330	-	-	Park <i>et al.</i> 2012
<i>G. resinaceum</i>	KCTC6288/ATCC52416	Argentina	AF094509	-	AF248332	-	Park <i>et al.</i> 2012
<i>G. resinaceum</i>	IMSNU32118/CBS152.27	UK	JQ520200	-	AF214472	-	Park <i>et al.</i> 2012
<i>G. resinaceum</i>	GR T096	Italia	AM906065	-	-	-	Guglielmo <i>et al.</i> 2008

Table 2. Continue...

Species	Herbarium Number	Origin	ITS	LSU	SSU	MnP	Reference
<i>G. resinaceum</i>	GR-101	India	GU451246	-	-	-	Mohanty <i>et al.</i> 2010
<i>G. resinaceum</i>	CBS, 19476	Netherlands	X78737/58	-	-	-	Moncalvo <i>et al.</i> 1995a
<i>G. resinaceum</i>	KCTC6453	Argentina	-	-	AF248334 / AF248335	-	Hong & Jung 2004
<i>G. sessile</i>	LDW 20121017	USA	KJ143917	-	-	-	Zhou <i>et al.</i> 2014
<i>G. sessile</i>	NY 00985711	USA	KJ143918	-	-	-	Zhou <i>et al.</i> 2014
<i>G. sessile</i>	BACFC 2373	Argentina	AF170005 / AF170006	-	-	-	Gottlieb <i>et al.</i> 2000
<i>G. subamboinense</i>	KCTC5464/ATCC52419	Argentina	X78736/57	X78784	AF248349	-	Moncalvo <i>et al.</i> 1995a
<i>G. subamboinense</i>	ATCC52420	Argentina	JQ520205	-	-	-	Hong & Jung 2004
<i>G. tornatum</i>	BAFC1172	Argentina	AF169975 / AF169976	-	-	-	Park <i>et al.</i> 2012
<i>G. tornatum</i>	BAFC2764	Argentina	AF169993 / AF169994	-	-	-	Gottlieb <i>et al.</i> 2000
<i>G. tuberculosum</i>	BAFC 2488	Argentina	AH008114	-	-	-	Gottlieb <i>et al.</i> 2000
<i>G. weberianum</i>	HMAS97365	China	JF915411	-	-	-	Wang <i>et al.</i> 2012
<i>G. weberianum</i>	CBS 219.36	Philippines	JQ520219	X78783	-	-	Moncalvo <i>et al.</i> 1995a
<i>G. weberianum</i>	CCRC 37081	Taiwan	Z37064/Z37086	X78783	-	-	Park <i>et al.</i> 2012
Moncalvo <i>et al.</i> 1995c							
MATERIAL STUDIED							
<i>As G. australe</i>							
<i>G. australe</i>	SP 417782 (CTRA-1)	Brazil	*	**	**	-	this study
<i>G. australe</i>	SP 417783 (CTRA-2)	Brazil	*	**	-	-	this study
<i>G. australe</i>	SP 417784 (CTRA-3)	Brazil	*	**	-	*	this study
<i>G. australe</i>	SP 417785 (CTRA-4)	Brazil	*	**	-	-	this study
<i>G. australe</i>	SP 417791 (CTRA-5)	Brazil	*	**	*	-	this study
<i>G. australe</i>	SP 417787 (CTRA-7)	Brazil	*	**	-	-	this study
<i>G. australe</i>	SP 417789 (CTRA-9)	Brazil	*	**	-	-	this study
<i>G. australe</i>	SP 417792 (CTRA-10)	Brazil	*	**	-	-	this study
<i>G. australe</i>	SP 417796 (CTRA-11)	Brazil	*	*	*	*	this study
<i>G. australe</i>	SP 417793 (CTRA-12)	Brazil	*	*	-	*	this study
<i>G. australe</i>	SP 445969 (RP-57)	Brazil	*	**	*	-	this study
<i>As G. gibbosum</i>							
<i>G. gibbosum</i>	SP 417786 (CTRA-6)	Brazil	*	**	*	-	this study
<i>G. gibbosum</i>	SP 417788 (CTRA-8)	Brazil	*	**	-	*	this study
<i>G. gibbosum</i>	SP 417774 (SPC-2)	Brazil	*	*	*	*	this study
<i>G. gibbosum</i>	SP 417775 (SPC-3)	Brazil	*	-	*	-	this study
<i>G. gibbosum</i>	SP 417776 (SPC-6)	Brazil	*	*	-	-	this study
<i>G. gibbosum</i>	SP 417798 (SPC-7)	Brazil	*	*	*	*	this study
<i>G. gibbosum</i>	SP 417777 (SPC-8)	Brazil	*	*	-	-	this study
<i>G. gibbosum</i>	SP 417799 (SPC-10)	Brazil	*	*	-	-	this study
<i>G. gibbosum</i>	SP 417794 (UB-1)	Brazil	*	*	-	-	this study
<i>G. gibbosum</i>	SP 417795 (UB-2)	Brazil	*	*	*	-	this study
<i>G. gibbosum</i>	SP 417781 (IBT-3)	Brazil	*	*	-	-	this study
<i>G. gibbosum</i>	SP - (IBT-4)	Brazil	*	*	-	-	this study
<i>G. gibbosum</i>	CUVC 60092(CC-23)	Colombia	*	*	-	-	this study
<i>G. multiplicatum</i>	SP 417797(SPC-5)	Brazil	*	-	*	*	this study
<i>G. multiplicatum</i>	SP 417778 (SPC-9)	Brazil	*	*	*	-	this study
<i>G. multiplicatum</i>	SP 417780 (IBT-2)	Brazil	*	*	*	*	this study
<i>G. multiplicatum</i>	CUVC 294(CC-8)	Colombia	*	*	-	-	this study
<i>As G. parvulum complex</i>							
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 672(CC-3)	Colombia	*	**	-	-	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 673(CC-4)	Colombia	*	**	-	-	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 674(CC-5)	Colombia	*	**	**	-	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 675(CC-6)	Colombia	*	**	**	-	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 676(CC-7)	Colombia	*	**	-	-	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 678(CC-9)	Colombia	*	**	-	-	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 680(CC-11)	Colombia	*	**	*	-	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 681(CC-12)	Colombia	*	**	-	*	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 682(CC1-3)	Colombia	*	**	*	-	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 683(CC-14)	Colombia	*	**	*	-	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 684(CC-15)	Colombia	*	**	*	*	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 685(CC-16)	Colombia	*	**	-	-	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 686(CC-17)	Colombia	*	**	*	-	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 697(CC18)	Colombia	*	**	-	*	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 698(CC-19)	Colombia	*	**	-	-	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 689(CC-20)	Colombia	*	*	*	-	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 693(CC-24)	Colombia	*	**	*	-	this study
<i>G. parvulum complex</i>	CUVC 696(TP-3)	Colombia	*	-	*	-	this study
<i>As Ganoderma sp.</i>							
<i>Ganoderma sp.</i>	CUVC 679(CC-10)	Colombia	*	*	*	-	this study

Table 2. Continue...

Species	Herbarium Number	Origin	ITS	LSU	SSU	MnP	Reference
<i>Ganoderma</i> sp.	CUVC 690(CC-21)	Colombia	*	-	-	-	this study
<i>G. subamboinense</i>	SP417773(SPC-1)	Brazil	*	*	*	*	this study
Outgroup							
<i>Amauroderma rude</i> var. <i>intermedium</i>	JM ASP.1	Taiwan	X78753/X78774	X78791	-	-	Moncalvo <i>et al.</i> 1995a
<i>Amauroderma rugosum</i>	THP30	-	HM480835	AB368061	HM480838	-	-

Discussion

We mainly discussed the clades were the collections made in this study were grouped. As several authors have already mentioned (Moncalvo 1991, Moncalvo & Ryvardeen, 1997), the lack of one single concept of species is often perceived in this phylogenetic analysis, and the most significant difficulty faced to delimitate the species found of *Ganoderma* genus. On the one hand, the Genbank does not have enough sequences enabling comparison among all species cited for South America. In this study, the phylogenetic analysis involved making a comparison among all the sequences that existing for lacquered and non-lacquered species in the Genbank. On the other hand, the Genbank does not have the same genes sequenced for the same specimens.

The clade A are subdivided in subclade 1, with *G. australe*, and subclade 2 with tentatively *G. gibbosum*. In the subclade 1, it was verified that several of the sequences correspond to synonyms of *G. australe* and the valid names are not used, as *G. tornatum* (Steyaert 1975, Moncalvo & Ryvardeen, 1997).

The sequences *G. lobatum* (AH008103) and *G. tornatum* (AF169993/4), are equal but the other sequence of *G. lobatum* (AH008102) presents highly nucleotide variability (Gottlieb & Whright 1999a), suggesting that probably they are misclassified. Despite the lack of the type species, the morphologic analysis of the samples related to group 1 matches the description of *G. australe* (Ryvardeen 2004).

For the samples of the subgroup 2, except for the presence of pseudostipe, the morphology matches with the description of *G. gibbosum* (Zhao 1999). According Moncalvo & Ryvardeen (1997) there is no lectotype for this species, and it is a great difficulty to delimitate it. Ryvardeen (2004) considered that *G. australe* is a non-lacquered species present in the Neotropics. According Moncalvo & Ryvardeen (1997) *G. gibbosum* was cited based in *Polyporus gibbosus* Blume & Nees, by Fries in *Elenchus Fungorum*, and it is a stipitate non-lacquered species. The last authors also mentioned that Lloyd (1912-1919) illustrate the species with a specimen from Brazil.

According to Gottlieb *et al.* (2000), it is convenient to accept the Humphrey & Leus (1931) proposal of eliminating the name *G. australe* (Fr.) Pat., because this name is confusing, the holotype does not exist, there are several concepts of this species and it has been impossible to establish its correct location and distribution.

In this phylogeny it is noteworthy that none of the non-lacquered samples from this study were grouped with *G. applanatum*. This result according with Moncalvo & Ryvarden (1997) validates the idea that *G. applanatum* only occurs in temperate zones.

In relation to the two monophyletic sequences recovered in the clade D, it is complicate to treat them as a new specie because there are just two collections and the morphologic characteristics are inadequate to perform a separation, and mainly because not all cited species for South America have been sequenced yet and the ones in the Genbank do not allow a real comparison. According (Moncalvo & Ryvarden 1997), *Ganoderma chalceum* located in this clade is synonym of *G. cupreum*, being the latter the valid name. According to this phylogenetic analysis, these two species are not the same species, indicating that probably they are not *G. chalceum*.

The clade E is named as *G. parvulum* complex, due to it grouping several species (*G. parvulum-tuberculosum-oerstedii-multipileum*). The low support for the samples and the few genes sequenced do not allow delimitations. For *G. parvulum* there are only the sequences of the region ITS and LSU from Brazil in the Genbank (Lima *et al.* 2014). For the *G. tuberculosum* and *G. oerstedii* there are only the ITS 1 and the ITS2 sequences in the Genbank (Gottlieb & Whright 1999). Although the samples appear in a subclade well separated, they do not have support to validated a proposal for a new specie. Apparently, they are more related to *G. parvulum*, *G. tuberculosum* or *G. oerstedii*, but morphologically they are similar to *G. multipileum* (fig.1 and 5). *G. multipileum* was identified through ITS analysis as *G. lucidum* from tropical Asia (Wang *et al.* 2009). There is a hypothesis to be approved that the dispersion of *G. multipileum* is anthropic, because it is one of the most commercialized species due to its medicinal value.

Long distance dispersion is one of the contemplated hypotheses to explain the wide distribution of the complex *G. applanatum-australe* (Moncalvo & Buchanan 2008).

The complex *G. parvulum* Murrill, was proposed by Steyaert (1980), where *G. stipitatum* (Murrill) Murrill was included. Lima *et al.* (2014) trough morphologic and phylogenetic studies with Brazilian collections, confirmed that *G. parvulum* and *G. stipitatum* are the same species. In relation to the other two species recuperated in this clade, *G. tuberculosum* and *G. oerstedii* are also considerate synonyms, being *G. oerstedii* the valid name (Steyaert 1980, Bazzalo & Wright 1982, Moncalvo & Ryvarden 1997). *G. parvulum* and *G. oerstedii*, both species were described in 1902 (Moncalvo & Ryvarden 1997). *G. parvulum* complex needed more studies including infertility test, more genes and different techniques as new DNA generation sequences.

The clade F is represented by *G. multiplicatum* that has a high bootstrap of support in this phylogenetic analysis. Morphologically this species is recognized because it presents cells with protuberant cuticle and basidiospores globose to ellipsoids (Ryvarden 2004, Torres-Torres *et al.* 2012).

In the clade H, the samples of *G. subamboinense* present a high bootstrap of phylogenetic support. When it was cultivated in malt extract the presence of chlamidospores was observed and it is characteristic of the species (Moncalvo *et al.* 1995b, Gottlieb & Wright 1999a). In relation to *G. multiplicatum* and *G. subamboinense*, Ryvarden (2000) consider that these species are synonyms, but these species looks like polyphyletic. In this clade also appears *G. sessile* and *G. resinaceum*, but *G. resinaceum* is the valid name (Moncalvo & Ryvarden 1997).

The ultrastructure pattern of basidiospore wall observed in the samples of *G. australe* and *G. gibbosum* also have been founded in other species no lacquered such as *G. applanatum*, *G. formosanum*, *G. neojaponicum*, *G. lobatum*, *G. adspersum* (Hseu 1990, Yeh 1999, Buchanan & Wilkie 1999, Gottlieb *et al.* 1999b). The rough pattern observed in the lacquered species *G. subamboinense*, is also cited for *G. oregonense* and *G. zonatum*, and the pattern of uniformly spaced depressions observed in the *G. multiplicatum*, *G. parvulum* and *Ganoderma* sp. is also characteristic of *G. meredithae* (Adaskave & Gilberston 1988). This character did not allow delimitate species.

In this study, the lacquered species *G. multiplicatum*, *G. subamboinense*, *G. parvulum*, complex, and one non-lacquered species, tentatively named *G. gibbosum* grow in several leguminous plants. From the other side, *G. australe* was founded as saprophyte. *Ganoderma* is considerate a facultative parasite fungus, that may grow as saprophyte until finding a susceptible host and establish a parasite relation (Turner 1981).

The legumes are important plants in the neotropics, that are used in urban arborization in places where they are subject to several pressures and anthropic injuries which probably facilitate the entrance of mycelium or spores of *Ganoderma*. *Ganoderma* has many white rot species, characterized for lignin and cellulose degradation trough the production of extracellular enzymes (Zhou *et al.* 2012). Probably the legumes wood represents a good substrate to the expression of peroxidases enzymes. Genomic studies have revealed in *Ganoderma* the presence of encoders genes of peroxidases-PODs enzymes (lignin peroxidase (LiP), Manganese peroxidase (MnP), versatile peroxidase (VP) and carbohydrate active enzymes, enzymes related to a lifestyle where survival depends on the degradation of lignin (Liu *et al.* 2012).

Taxonomy

Ganoderma australe (Fr.) Pat., Bull. Soc. Mycol. Fr. 5: 67, 1889

Type: Pacific Islands (according to Moncalvo & Ryvarden (1997), the only authentic specimen in K probably not correspond to the original collection)

Basionime: *Polyporus australis* (Fr.), Elenchum Fungorum 1: 108 (1828)

Synonyms: see Mycobank.org

Substrate: dead stump

Distribution: Pantropical and frequent in tropical America (Ryvarden, 2004).

Material examined: Brazil: São Paulo, SP445969(RP-57), SP417782(CTRA-1), SP417783(CTRA-2), SP417784(CTRA-3), SP417785(CTRA- 4), SP417791(CTRA-5), SP417787

(CTRA- 7), SP417789(CTRA- 9), SP417792 (CTRA-10), SP417796(CTRA-11), SP417793 (CTRA-12).

Description:

Basidioma perennial, flat, ungulate, irregular, usually dimidiated and semicircular, variable size, 4-40cm long, 4-20 cm wide and up to 10 cm thick, hard when dry. Opaque pileus, cacao brown to grey to almost black in old specimens, grey when dead, surface glabra, clearly furrowed in variable zones, brittle with age, sometimes covered with cinnamon to light cacao spores. Cuticle black, 0.2-3mm thick, thicker nearer the substrate. Margin whitish to yellow colored in growing specimens. White to light beige pored surface, darker when hurt, turning brown with age, with roundish, whole pores, with lightly thickened wall, 3-5 per mm, dark brown tubes sometimes stuffed with white mycelium at older parts, little stratified, until 6 cm long. Dark brown context, rarely with white spots, frequently with one or several horizontal black and resinous stripes over the tubes, sometimes absent in some specimens. The hyphal system is dimitic, generating hyphae with clamp-connections, thin wall, hyalines, 1.5-3 μm diameter; skeletal hyphae up to 6 μm diam. branched or not, with arboriform ends. Barrel-shaped basidio, 15-20 x 6-10 μm , tetrasterigmata, golden brown cut-off basidiospore with spiny wall, 7-12 x 5-8 μm (fig 2).

Cultural characteristics: white culture, not dark with age, velvet-like, radiated, zonate or not, septed hyphae with clamp-connection, 2.5 μm diameter, hyaline; without clamidospores.

The ornamentation of the basidiospore surface presented longitudinal cavities under scanning microscope.

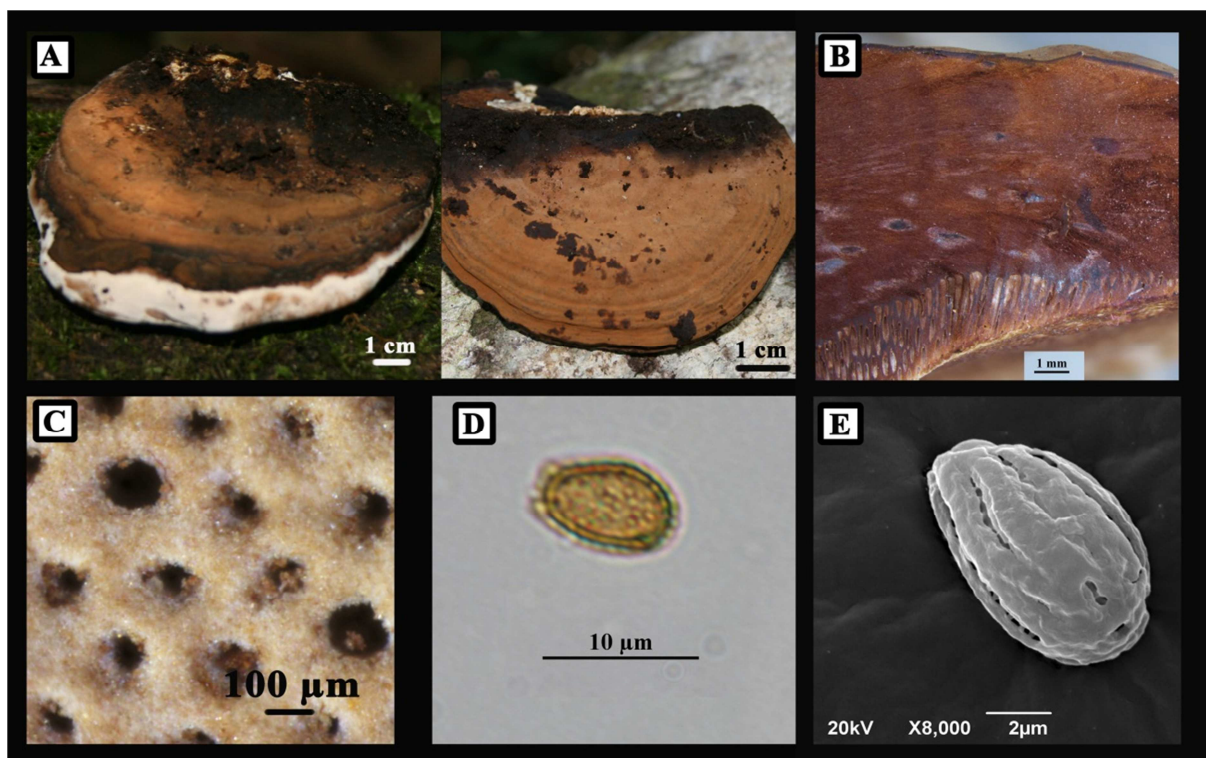


Figure 2. *G. anoderma australe*. A). Basidiomata. B). Context. C). Pores. D, E). Basidiospores

Ganoderma gibbosum (Blume & T. Nees) Pat., Annales du Jardin Botanique de Buitenzorg Suppl. 1: 114 (1897) [MB#250058]

Type: Java (Not Found)

Basionime: *Polyporus gibbosus* Blume & T. Nees, Nova Acta Academiae Caesarea Leopoldino-Carolinae Germanicae Naturae Curiosorum 13: 19, t. 4:1-4(1826).

Synonym: see www.Mycobank.org

Distribution: China, Indonesia, Brazil and Colombia (Zhao 1989, Moncalvo & Ryvardeen 1997).

Substrate: *Inga edulis* Mart., *I. vera* Kunth, *Caesalpinia peltophoroides* Benth., and on dead stump of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

Material examined: Brazil. São Paulo. São Paulo, urban area, SP417774 (SP-2), SPC-3, SP417776 (SPC-6), SP417798 (SPC-7), SP417777 (SPC-8), SP417799 (SPC-10), SP417794 (UB-1), SP417795(UB-2), SP417781 (IBT-3), SP417786 (CTRA-6), SP417788(CTRA-8). Colombia, Cali, urban area, CC-23 deposited in CUVIC Herbarium of Universidad del Valle and replicate in SP, São Paulo.

Description:

Basidioma annual to perennial, stipitated or sessile, leathery to very hard. Pileus not laccated, dimidiata to sublabeliform, 4-13 x 5-9 x 2 cm; ferrous to yellowish or reddish brown abhymenial surface, concentrically zonate, with bright, rimmed pilear crust, whole and obtuse margin. Brown or yellow-mustard context, 0.5-1.2 thick. Brown tubes 0.2 – 1 cm long. White or brown porous surface with sub-orbicular pores, 4-5 for mm. Laterally short stipited, 4-8 cm long and 1-3 cm diam., sometimes bifurcated, thicker at the base, concolor with the pileus. Pilear crust similar to a subanixeroderm composed with generative hyaline hyphae with thin walls, 4.5-6 µm diam. become darker when old and branched with inflated and subglobose endings and brown skeletal hyphae with thicker walls. The branched skeletal hyphae are 80-100 µm long, 4-7.5 µm diam. Context hyphal system trimitic, hyaline or light yellowish generative hyphae with thin wall, septated with clamp connection, 2-4 µm diam.; reddish brown skeletal hyphae with thick wall, arboriform and aciculariform, hyaline to light brown conjunctive hyphae with thick wall, branched, 1-2 µm diam. Basidiospores 6.9- 8.7 X 5-5.2 µm, egg-shaped and truncated at the apex, bitunicated, hyaline exospore smooth, dark brown spiny endosporium (fig 3).

Cultural characteristics: white culture, velvet, not zonated, always white with age. Septated hyphae, 2 µm wide, with clamp-connections, hyaline to light yellow, branched. Chlamidospores absent.

The analysis of basidiospore wall through scanning microscopy showed that this species is characterized by no open longitudinal cavities.

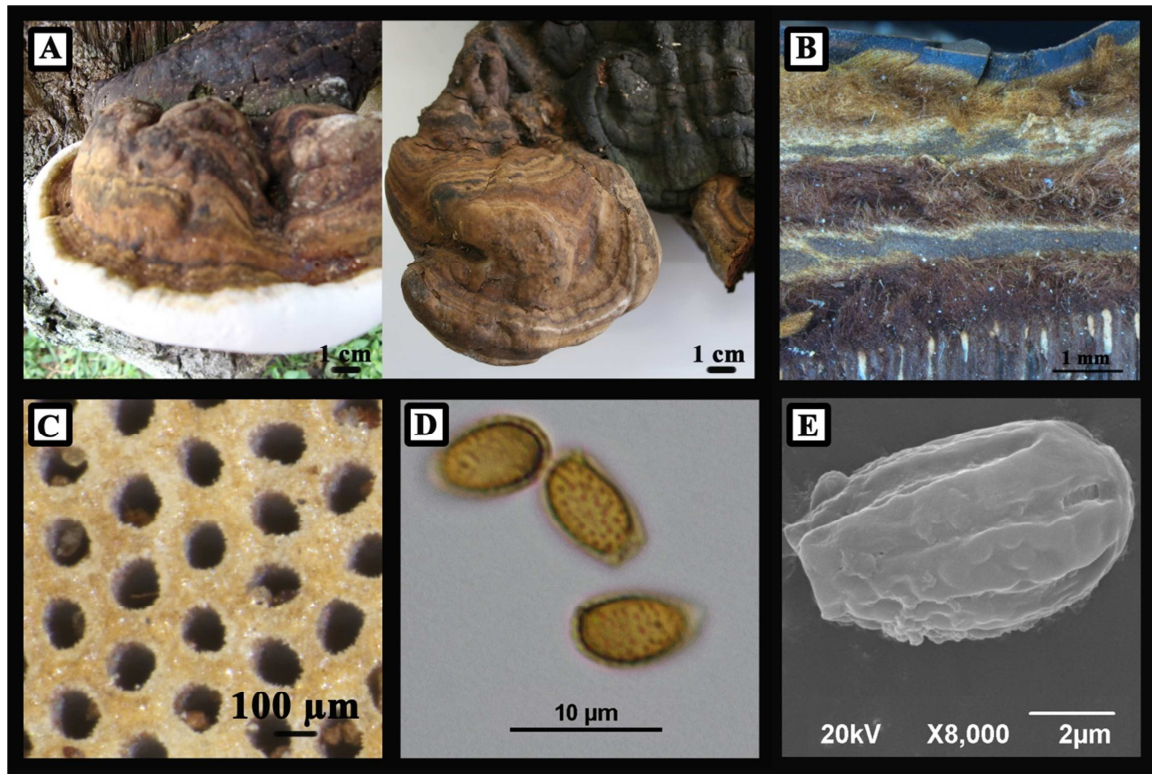


Figure 3. *Ganoderma gibbosum*. A). Basidiomata. B). Context. C). Pores. D, E). Basidiospores.

Ganoderma multiplicatum (Mont.) Pat. Bull. Soc. Mycol. Fr. 5:74, 1889.

Type: French Guyana

Basionime: *Polyporus multiplicatus* Mont., Annales des Sciences Naturelles Botanique 1: 28 (1854)

Synonyms ≡ *Polyporus multiplicatus* Mont., Annales des Sciences Naturelles Botanique 1: 128 (1854).

≡ *Fomes multiplicatus* (Mont.) Cooke, Grevillea 14(69): 18(1885)

≡ *Scindalma multiplicatum* (Mont.) Kuntze, Revisio generum plantarum 3:519 (1898)

Substrate: Dead hardwoods, leguminous tree.

Distribution: Brazil, Colombia, Venezuela, French Guyana, Angola, India, Indonesia, Ivory Coast, Sierra Leone, Zaire, Zambia (Torres-Torres *et al.* 2012, Bolaños *et al.* 2016).

Material examined: Brazil. São Paulo, SP417797(SPC-5), SP417780 (IBT-2), SP417780 (IBT-2). Colombia. Cali, CUV 294(CC-8)

Description:

Basidioma perennial, pileated, dimidiate to sessile and broadly attached, corky to woody, 14x10x3 cm; upper surface flat, usually strongly sulcate, glabrous and shiny laccate, pale to light brown to deep reddish to chesnut brown becoming darker by age. Margin in actively growing specimens usually white light coloured. Pore surface creamy white at first, later ochraceous to pale brown, pores round, 6-8 per mm; tubes concolorous with pore surface, up to 6mm long close to the stipe. Hyphal system dimitico; generative hyphae hyaline, thin-walled, with clamp connection, 2-5μm diam, difficult to observe in dried specimens; skeletal hyphae abundant, thick-walled, yellowish brown, unbranched or with a few distal branches. 3-6μm diam. Cuticle: a palisade or swollen hyphal ends, some smooth, but mostly with small

protuberances, strongly amyloid. Basidiopores subglobose or broadly ellipsoid, truncate at the apex, $8.4\text{--}9.7 \times 5.8\text{--}7.0\mu\text{m}$ (fig 4).

Cultural studies: colony white, velvet, not zonated, yellow with age. Septated hyphae, $2.5\mu\text{m}$ wide, with clamp-connections, hyaline to light yellow, branched. Chlamidospores present or absent. The ornamentation of the basidiospore surface presented uniformly spaced depressions under scanning microscope.

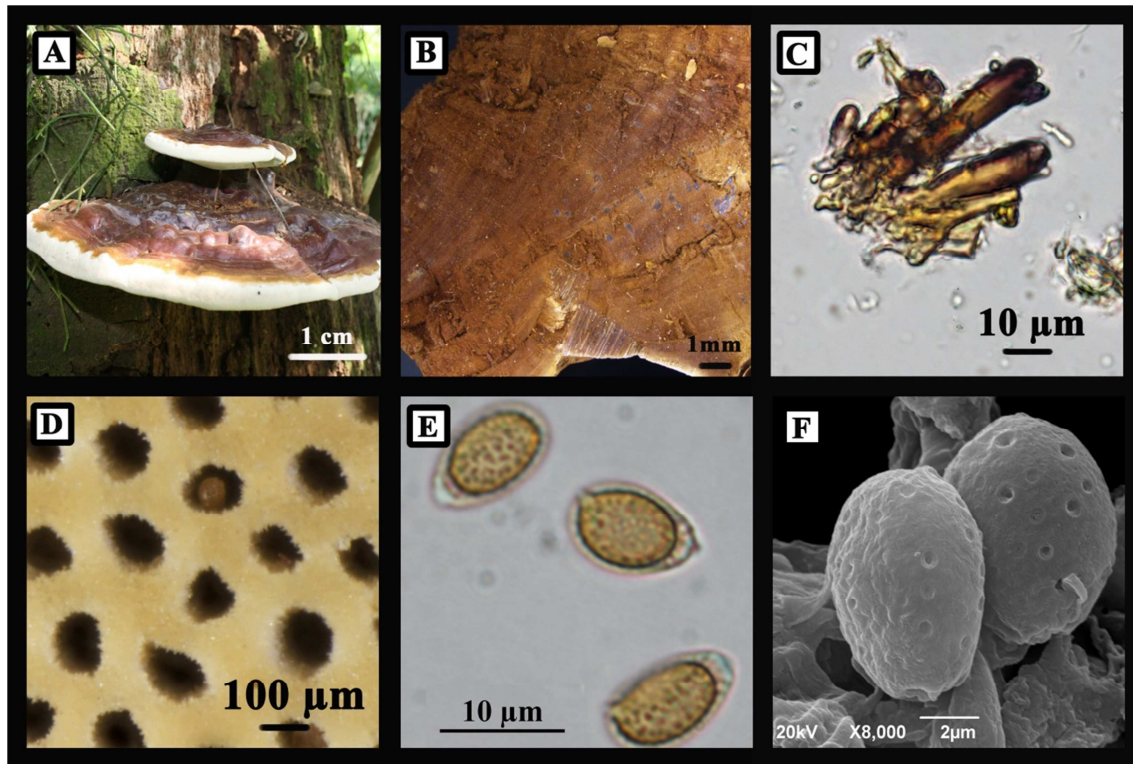


Figure 4. *Ganoderma multiplicatum*. A). Basidiomata. B). Context. C). Cuticle cells D.) Pores. E, F). Basidiospores

G. subamboinense (Henn.) Bazzalo & Wright, Mycotaxon, v. 16, p. 302. 1892.

Type: Brazil

Basionime: *Fomes subamboinense* Henn., Hedwigia, v. 43, p. 175. 1904

Synonyms: $\equiv$ *Fomes subamboinensis* Henn., Hedwigia 43 (3): 175 (1904)

Substrate: *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul

Distribution: Argentina, Brazil (Gottlieb & Wright 1999).

Material examined: Brazil, São Paulo, SP417773 (SPC-1).

Description

Basidioma dimidiate or more frequently stipitate flabelliform, with isolated pilei or sometimes conrescent, $13\text{--}35 \times 2.5\text{--}10.5 \times 0.2\text{--}1.5\text{cm}$. Pileus surface laccate brilliant, radially rugose, with concentric sulcations, undulate, dark reddish brown, gradually becoming lighter towards the margin, very brittle, thin. Margin sterile, straight, yellowish white, thin and acute. Stipe horizontal, tortuous, dark reddish to almost black, brilliant. Context thin up to 1 cm wide,

cream, almost white, with two or more layers of melanoid substance. Hyphal system dimitic, generative hyphae with septa restricted to clamps, sparingly branched, 1-3 μm diam. skeletal hyphae underlying the cutis generally amyloid. Tubes 1-4 mm long, concolorous with abhymenial surface. Hymenial surface concolorous with the margin, pores circular, 4-7 mm. Cutis of the hymeniodermis vera type, composed of clavate elements, some of them diverticulated at the base, IK + + + (dark grey to dark blue), 50-60x5-10 μm . Basidiospores broadly ellipsoid, smooth to ornamented, brown, 8-10x6-7 (8) μm ; Chlamydospores smooth, dextrinoid, in context, 10-11x10-13 μm (fig 5).

Cultural studies: colony white, velvet, not zonated, yellow with age. Septated hyphae, 3 μm wide, with clamp-connections, hyaline to light yellow, branched. Chlamydospores present. The ornamentation of the basidiospore presents rough surface under scanning microscope.

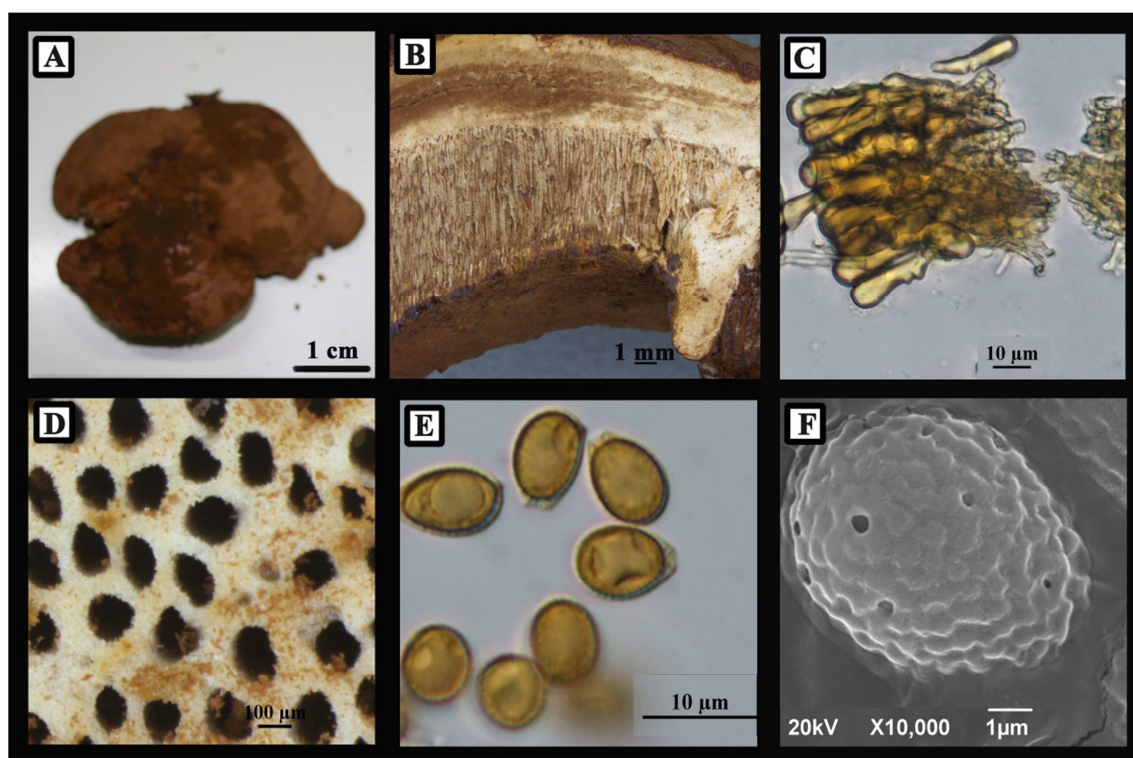


Figure 5. *Ganoderma subamboinense* A). Basidiomata. B).Context. C).Cuticle cells D.) Pores. E, F). Basidiospores

G. parvulum complex

Material examined: Colombia, Cali, CUV60070, CUV60071, CUV60072, CUV60073, CUV60074, CUV60075, CUV60076, CUV60077, CUV60078, CUV60079, CUV60080, CUV60081, CUV60082, CUV60083, CUV60084, CUV60085, CUV60086, CUV60087, CUV60088, CUV60089, CUV60090, CUV60091, CUV60092, CUV60093, CUV60094, CUV60095, CUV60096 and CUV60097.

Substrate: live tree of leguminous (See table 1).

Description:

Basidiomata annual, stipitated, rarely sessil or substipitated, leathery. Pileus 46-16 x 2.8-5.5 cm, kidney-shaped, dimidiated, imbricated, sometimes with welded pileus growing all

together, yellowish orange, reddish yellow or reddish brown, lightly or strongly laccated. Light beige hymenial surface when young, turning straw or light chestnut when older; circular or subcircular pores, 3-8 per mm, 60-220 μm diam. Tubes 1.1-1.5 cm long, light chestnut to brown. Stipe when present 1-13 x 1.6- 3.5 cm; flat, subcylindrical, lateral, dorso-lateral or horizontal lateral, reddish brown, dark purple, strongly laccated. Cutis with clavated cells a few dextrinoids or strongly amyloids, 20-60x 4.8-9.5 μm ; Pores: 5-6 mm,. Context 0.6-2.1 cm thick, chestnut to dark brown, sometimes with resinous bands, leathery consistency; fine generative hyphae 1.0-2.0 μm , skeletal hyphae 1.57-7 μm diam., yellowish chestnut to reddish brown in KOH, dextrinoid; bovista-type connective hyphae 1.2-2 μm diam., rare, light, with thickened walls, very branched. Basidiospores 9 -10.1 x 5.8-7.0 μm , egg-shaped to ellipsoid-shaped, truncated, brown with thin dark brown, conspicuous spiny (Fig 6).

Cultural characteristics: yellowish white culture with age, zonated or not, sectorized, with irregular margin, sometimes with chlamidospores; generating hyphae septated with clamp connections 2.5 μm diam.

The analysis of wall through scanning microscopy showed basidiospore with spaced depressions on the surface.

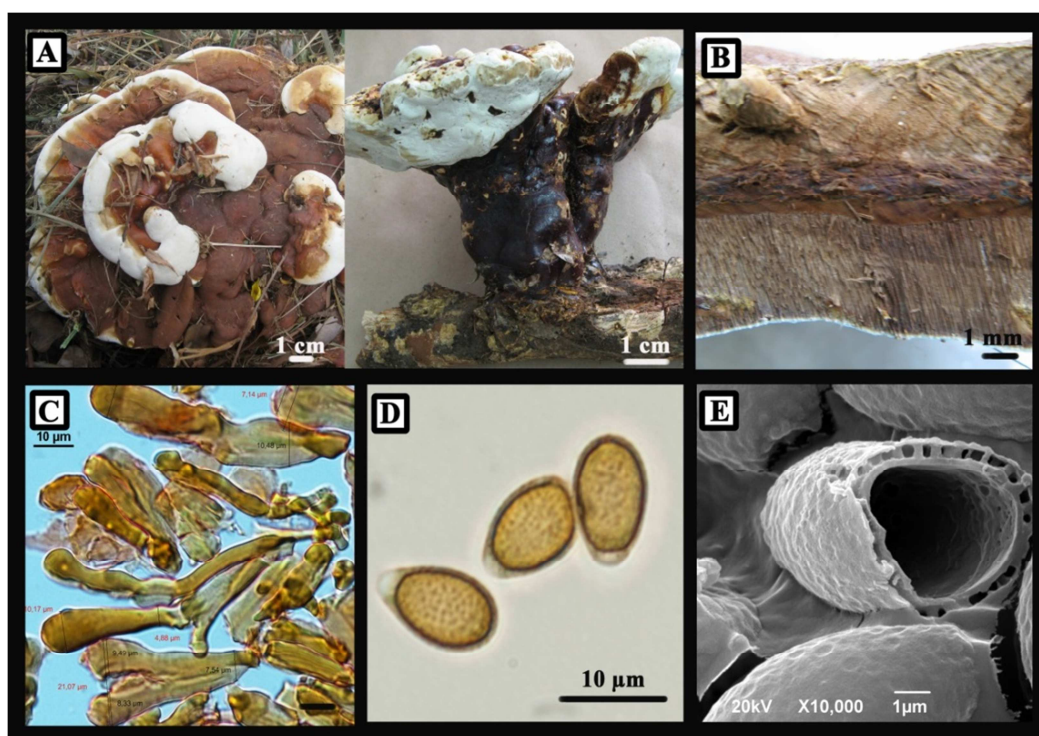


Figure 6. *Ganoderma parvulum* complex. A).Basidiomata. B).Context. C).Cuticle cells D, E). Basidiospores.

Ganoderma sp.

Material examined: Colombia, Cali, CUV60079(CC-10) and CUV60090(CC-21).
Substrate: live tree of leguminous (See table. 1).

Description:

Basidioma annual, sessil or substipitated, leathery. Pileus 25-11 x 1.0-2.0 cm, dimidiated, imbricated, yellowish orange, reddish yellow or reddish brown, lightly or strongly laccated. White hymenial surface when young, turning into straw or light chestnut when older. Cutis with clavated cells, a few dextrinoids, 10-40x 5.0-9.0 μ m; Pores ovate, 4-5 per mm, 111-175 μ m diam. Tubes 1.8-3.5mm, light chestnut to brown. Context 0.8-1.7 cm thick, chestnut to dark brown, sometimes with resinous bands, hard consistency; fine generative hyphae 0.8-1.6 μ m, skeletal hyphae 2.1-6.23 μ m diam. yellowish chestnut to reddish brown in KOH, dextrinoid; connective hyphae 1.0-1.5 μ m diam. Basidiospores 9.3 -11.0 x 5.9-8.9 μ m, egg-shaped to ellipsoid-shaped, truncated, yellow to brown and spiny (fig. 7).

Cultural characteristics: white colony, azonated, with age yellowish white, zonated or not, not sectorized, irregular margin, chlamidospores absent, generative hyphae septated with clamp-connections 1.5 μ m diam.

The analysis of basidiospore wall under scanning microscopy showed basidiospore wall with spaced depressions on the surface.

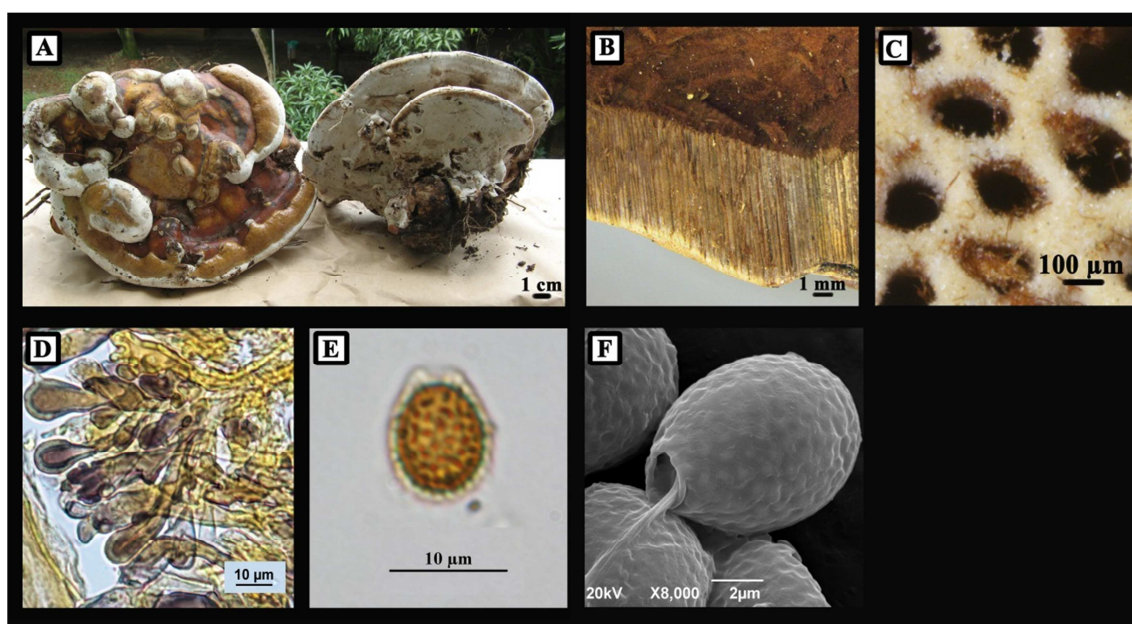
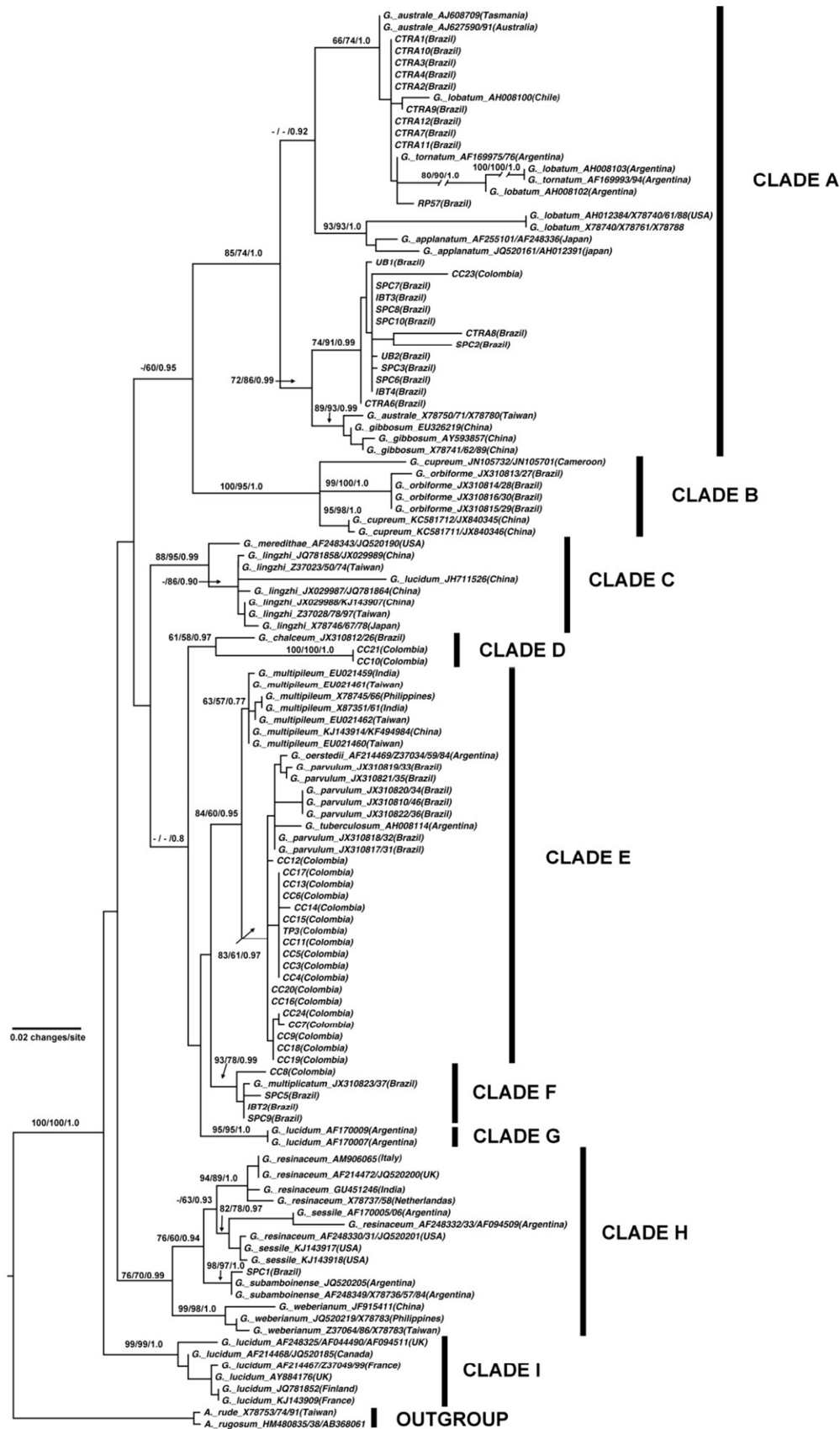


Figure 7. *Ganoderma* sp. A).Basidiomata. B). Context C). Pores. D). Cuticle cells. E,F). Basidiospores.

Acknowledgements

Authors thank FAPESP and Universidad del Valle for the financial support of this project. We thank Dr. Carmen L. Zotarelli in the Botanical Garden of São Paulo for allowing us to use her molecular laboratory. We are indebted to the prefeitura of São Paulo for help to collect the specimens in the urban area in the city of São Paulo. We also thanks to Viviana Motato for helping collecting some specimens in the Cantareira Reserve, Ricardo Mateus Pyres in Santa Virgínia Reserve and Robert T. Gonzales and Myriam Monsalve for their colaboration in

collecting some Colombian specimens included in this analysis. We would like to thank Alex Mora for his help with the molecular analyses in PAUP program, Felipe Ortega and Irvin Castro for taking the photographs in the optical and scanned Microscopic.



Annex 1. ITS tree and reconstruction of the phylogenetic history of the sequences of *Ganoderma* species. Statistical support nodes include the maximum parsimony bootstrap, maximum likelihood and Bayesian respectively.



Annex 2. LSU tree and reconstruction of the phylogenetic history of the sequences of *Ganoderma* species. Statistical support nodes include the maximum parsimony bootstrap, maximum likelihood and Bayesian respectively.

Bibliographic references

- Adaskave, J.E. & Gilbertson, R.L. (1988) Basidiospores, pilocystidia, and other basidiocarp characters in several species of the *Ganoderma lucidum* complex. *Mycologia* 80:493– 507.
- Baltazar, J.M. & Gilbertoni, T. (2009) A checklist of Aphyllorphoroid fungi (Basidiomycota) recorded from the Brazilian Atlantic Rain Forest. *Mycotaxon* 109: 439-442.
- Bazzalo, M.E. & Whright, J.E. (1982) Survey of the Argentine species of the *Ganoderma lucidum* complex. *Mycotaxon* 16: 295-325.
- Bazinet, A., Zwickl, D.J. & Cummings, M.P. (2014) A Gateway for Phylogenetic Analysis Powered by Grid Computing Featuring GARLI 2.0. *Systematic Biology*. 0:1–7.
- Bononi, V.R.L., Trufem, S.F.B. & Grandi, R.A. (1981) *Fungos macroscópicos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brazil*. Herbário do Instituto de Botânica. Rickia, São Paulo 37-53 pp.
- Bononi, V.R.L., de Oliveira, A.K.M., de Quevedo, S.R. & Gugliotta, A.M. (2008) Fungos macróscopicos do Pantanal do Rio Negro, Mato grosso do Sul. Brazil. *Hoehnea* 35:489-511.
- Bolaños, A.C., Bononi, V.R.L., Gugliotta, A. 2016. New records of *Ganoderma multiplicatum* (Mont.) Pat. from Colombia and geographic distribution in South America (Submitted to Ckeck List *The Journal of Biodiversity Data*.)
- Buchanan, P.K. & Wilkie, J.P. (1995) Taxonomy of New Zeland *Ganoderma*. Two non-laccate species. in: Buchanan, P. K., Hseu, R.S. & Moncalvo, J. M. (Ed.), *Ganoderma: Systematics, Phytopathology and Pharmacology*. Proceedings of contributed Symposia 59A, B, 5TH International Mycological Vancouver, pp. 7-17.
- Cao, Y., Wu, S-H. & Dai, Y-C. (2012) Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom “Lingzhi”. *Fungal Diversity* 56:49–62.
- Chen, S., Xu, J., Chang, L., C.H., Yingjie. Z., Nelson, D.R., Zhou, S., Li, C., Wang, L., G, Xu., Sun, Y., Luo, H., Li. Y., Y. Song, J. , Henrissat, B., Levasseur, A., Qian, Jun, Q., Li, J., Luo, X., Shi, L. ; He, L., Li, X., Xu, X., Yunyun, N., Li, Q., Han, M.V., Yan, H., Zhang, J., Chen, H. , Aiping, Lv7. , Wang, Z., Liu, M.; Schwartz, D.C. & Sun C. (2012) Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nature Communications* 3:913.
- Drescheler-Santos, E.R., Groposo, C. & Logercio-Leite, C. (2008) Additions to the knowledge of lignocellulolytic Basidiomycetes in forest from Santa Catarina, Southern Brazil. *Mycotaxon* 103: 197-200.
- Drescheler-Santos, E.R., Gilbertoni, T.B., Goes-Neto, A. & Calvanti, M.A.O. (2009) A re-evaluation of the lignocellulolytic Agaricomycetes from the Brazilian Semi-arid region. *Mycotaxon* 108: 241-244. [Http//dx.doi.org/10.5248/108241](http://dx.doi.org/10.5248/108241).

- Felsenstein, J. (1985) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Society for the Study of Evolution* 39(4): 783-791
- Fidalgo, M.E.P.K. (1968) Contribution to the fungi of Mato Grosso, Brazil. *Rickia* 3: 171-219.
- Fidalgo, O. & Bononi, V. L. (1984). *Técnicas de Coleta, Preservação e herborização de material botânico*. Instituto de Botânica. São Paulo.
- Furtado, J. S. (1967) Some tropical species of *Ganoderma* (Polyporaceae) with pale contexto. *Persoonia* 4: 379- 389.
- Gerber, A.L. (1996) Fungos xilófilos poroides (Aphylllophorales) no morro da Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina. *Insula* 25:3-68.
- Gerber, A.L. & Loguerio-Leite, C. (1997) new records of Polypores (Aphylllophorales) from Southern Brazil. *Mycotaxon*:05-318.
- Glen, M. L., Bougher, N.L., Francis, A.A., Nigg, S.Q., Lee, S.S., Irianto, R., Barry, K.M., Beadle, C.L. & Mohammed, C.L. (2009) *Ganoderma* and *Amauroderma* species associated with root-rot disease of *Acacia mangium* plantation trees in Indonesia and Malaysia. *Australasian Plant Pathology* 38: 345–356.
- Gilbertson, R. l. & Ryvardeen, L. (1986) *North American Polypores. Part 1*. Fungiflora, Oslo.
- Gilbertoni, T.B. & Cavalcanti, C. (2003) A micological survey of the Aphylllophorales (Basidiomycotina) of the Atlantic Rain Forest in the state of Pernambuco, Brazil. *Mycotaxon* 87: 203-211.
- Gilbertoni, T.B. & Drescheler-Santos, E.R. (2010) Lignocellulolytic Agaricomycetes from de Brazilian Cerrado biome. *Mycotaxon* 111:87-90. [http// dx.doi.org/10.5248//111.87](http://dx.doi.org/10.5248//111.87)
- Goes-Neto, A., Marques, M.F.O., Andrade, J.D. & Santos, D.S. (2003) Lignicolous aphylllophoroid Basidiomycota in an Atlantic forest fragment in the semi-arid caatinga region of Brazil. *Mycotaxon* 88: 359–364.
- Gomes-Silva, A.C., Ryvardeen, L. & Gilbertoni, T. B. (2011) New records of Ganodermataceae from Brazil. *Nova Hewdigia* 92: 83-94.
- Gottlieb, A.M., Saidman, Z.O. & Wright, J.E. (1998) Isoenzymes of *Ganoderma* species from southern South America. *Mycological Research* 102: 415-426.
- Gottlieb, A.M. & Wright, J.E. (1999a) Taxonomy of *Ganoderma* from Southern South América: Subgenus *Ganoderma*. *Mycological Research* 103: 661-673.
- Gottlieb, A.M. & Wright, J.E. (1999b) Taxonomy of *Ganoderma* from Southern South América: Subgenus *Elfvingia*. *Mycological Research* 103: 1289-1298.
- Gottlieb, A.M., Ferrer, E. & Wright, J.E. (2000) rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma*. *Mycological Research* 104:1033-1045.

- Groposo, C. & Loguercio-Leite, C. (2005) Contribution to the lignocellulolytic fungi (Basidiomycetes) of the Atlantic Rain Forest in Southern Brazil. *Mycotaxon* 92: 103-106.
- Guglielmo, F., Gonthier, P., Garbelotto, M. & Nicolotti, G. (2008) A PCR-based method for the identification of important wood rotting fungal taxa within *Ganoderma*, *Inonotus* s.l. and *Phellinus* s.l. *FEMS Microbiology Letters* 282: 228–237.
- Gugliotta, A. M., Poscolere, G.D. & Silva, T.V. (2011) Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brazil. Fungos, 10: Ganodermataceae. *Hoehnea* 38(4): 687-695.
- Gugliotta, A. M., Abrahão, M. C., & Gibertoni, T. B. (2013) *Polyporales in Lista de Espécies da Flora do Brazil*, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Available from <http://floradoBrazil.jbrj.gov.br/jabot/floradoBrazil/FB92411> (accessed: 20-II- 2015).
- Hseu, R-S., Wang, H-H., Wang, H-F. & Moncalvo, J-M. (1996) Differentiation and Grouping of Isolates of the *Ganoderma lucidum* Complex by Random Amplified Polymorphic DNA-PCR Compared with Grouping on the Basis of Internal Transcribed Spacer Sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1354- 1363.
- Hseu, R.S. (1990) *An identification system for cultures of Ganoderma species*. PhD thesis, National Taiwan University. Taiwan.
- Hong, S.G., Jeong, W. & Jung, H.S. (2002) Amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of polypores and its potential for phylogenetic analysis. *Mycologia* 94: 823–833.
- Hong, S.G. & Jung, H.S. (2004) Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 96: 742-755.
- Humphrey, C. J. & Leus, S. (1931) Studies and illustrations in the Polyporaceae II. Supplementary notes on the *Ganoderma applanatum* group. *Philippine Journal of Science* 49:159-184.
- Isikhuemhen, O.S., James, J., Liou, S.R., Stoychev, I., Eichlerová, I., Nerud, F. & Vilgalys, R. 2002. *Genetic and physiological characterization of two ligninolytic enzymes in two geographically isolated strains of Pleurotus djamor*. Monography Chapter: Proceeding of the Fourth International Conferences. Mushroom Biology and Mushroom products. Mexico. Available from: <http://hdl.handle.net/11104/0051952> Pag 133-140. (accessed: 18 Nov 2015)
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H. & Myarata, T. (2005) MAFFT version 5: Improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33: 511-518.
- Karsten, P.A. (1881) Enumeratio Boletinearum et Polyporearum Fennicarum Systemate novo Dispositarum. *Revue Mycologique Toulouse* 3:16-19
- Korbie, D.J. & Mattick, J.S. (2008) *Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification*. *Nature protocols*. Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland, St Lucia, Australia.

- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W. & Guindon, S. (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1695-1701. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mss020>
- Lima, N.J., Baptista, G., & Malosso, E. (2014). Delimitation of some neotropical laccate *Ganoderma* (Ganodermataceae): molecular phylogeny and morphology. *Revista de Biología tropical* 62:1197-1208.
- Liu, D., Gong, J., Dai, W., Kang, X., Huang, Z., Zhang, H-M., Liu, W., Liu, L., Ma, J., Xia, Z., Chen, Y., Wang, D., Ni, P., Guo, A-Y. & Xiong, X. (2012) The Genome of *Ganoderma lucidum* Provide Insights into Triterpene Biosynthesis and Wood Degradation. *PLoS ONE* (7)5 doi: 10.1371/journal.pone.0036146
- Loguercio-Leite, C.N. & Wright, J.E. (1991) Contribution to a biogeographical study of the Austro-American Xylophilous Polypores (Aphyllporales) from Santa Catarina. *Mycotaxon* 41: 161-166.
- Loguercio-Leite, C., Groposso, C. & Halmenschlager, M.A., (2005) Species of *Ganoderma* Karsten in a subtropical area (Santa Catarina State, Southern Brazil). *Iheringia, sér. Bot.* 60:135-139.
- Lloyd, C.G. (1912-1919) *Index of mycological writings Vol 5*. Cincinnati, Ohio, U.S.A.
- Meijer, A.A.A. de. (2001) Mycological work in the Brazilian state of Paraná. *Nova Hedwigia* 72:105-159.
- Meijer, A.A.A. de. (2006) Preliminary list of the Macromycetes from the Brazilian state of Paraná. *Boletim do museu Botânico Municipal Curitiba*, 68:1-55.
- Mohanty, PS., Harsh, N.S.K. & Pandey, A. (2011) First report of *Ganoderma resinaceum* and *G. weberianum* from north India based on ITS sequence analysis and micromorphology. *Mycosphere* 2: 469–474.
- Moncalvo, J.M., Wang, H.F. & Hseu, R.S. (1995a) Phylogenetic Relationships in *Ganoderma* Inferred from the Internal Transcribed Spacers and 25S Ribosomal DNA Sequences. *Mycologia* 87: 223-238.
- Moncalvo, J.M., Wang, H.F. & Hseu, R.S. (1995b) Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. *Mycological Research* 99: 1489-1499.
- Moncalvo, J.M., Wang, H.F. & Hseu, R.S. (1995c) The use of ribosomal DNA sequence data for species identification and phylogeny in the Ganodermataceae. in: Buchanan, P. K., Hseu, R.S. & Moncalvo, J. M. (Ed.), *Ganoderma: Systematics, Phytopathology and Pharmacology*. Proceedings of contributed Symposia 59A, B, 5TH International Mycological Vancouver, pp. 31-44.
- Moncalvo, J.M. & Ryvarden, L. (1997) *A nomenclatural Study of the Ganodermataceae Donk*. Synopsis Fungorum 11, Fungiflora, Oslo.

- Moncalvo, J.M. & Buchanan, P.K. (2008). Molecular evidence for long distance dispersal across the Southern Hemisphere in the *Ganoderma applanatum-australe* species complex (Basidiomycota). *Mycological Research* 111:425-436.
- Nascimento, L., Queiroz-Cavalcante, M.A., Fontes-Urben, A. & Cortopassi-Buso, G.S. (2011) Use of RAPD molecular markers on differentiation of Brazilian and Chinese *Ganoderma lucidum* Strains. *Brazilian archives of Biology and Technology* 54:273-281.
- Núñez, M. & Ryvarden, L. (2000) *East Asian Polypores, Ganodermataceae and Hymenochaetaceae, Vol. 1*. Fungiflora, Oslo. 168pp.
- Nylander, J.A.A., Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. & Nieves-Aldrey, J.L. (2004) Bayesian Phylogenetic Analysis of Combined Data. *Systematic Biology* 53:47–67.
- Patouillard, N. (1889) Le genre *Ganoderma*. *Bulletin trimestriel de la Société mycologique de France* 5:64-80.
- Park, Y.J., Kwon, O.C., Son, E.S., Yoon, D.E., Han, W., Nam, J.Y., Yoo, Y.B. & Lee, C.S. (2012) Genetic diversity analysis of *Ganoderma* species and development of a specific marker for identification of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *African Journal of Microbiology Research* 6:5417-5425.
- Rajchernberg, M. & Meijer, A.A.A. (1990) New and noteworthy Polypores from Parana and Sao Paulo states, Brazil *Mycotaxon* 38:173-185.
- Raeder, U. & Broda, P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied microbiology* 1: 17-20.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D. & Drummond, A.J. (2014). Tracer v. 1.6, Available From: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (accessed: 18 Nov 2015)
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) ‘MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models’. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Ryvarden, L. & Johansen, I. (1980) *A preliminary polypore flora of east Africa*. Fungiflora, Oslo.
- Ryvarden, L. (1991) *Genera of Polypores. Nomenclature and taxonomy*. Synopsis fungorum 5, Fungiflora, Oslo, Norway.
- Ryvarden, L. & Gilbertson, R.L. (1993) European Polypores 1. *Synopsis Fungorum* 6:1– 387.
- Ryvarden, L. (2000) Studies in Neotropical polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia* 92:180-191.
- Ryvarden, L. (2004) *Neotropical Polypores: Part 1. Introduction, Ganodermataceae & Hymenochataceae*. Fungiflora, Oslo.

- Smith, B.J. & Sivasithamparam, K. (2000) Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of five species of *Ganoderma* from Australia. *Microbiology Research* 104: 943-951.
- Swofford, D.L. (2002) *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- Steyaert, R.L. (1962) Genus *Ganoderma* (Polyporaceae). Taxa nova II. *Bulletin du Jardin Botanique de l'État à Bruxelles* 32:89-104.
- Steyaert, R.L. (1972) Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bogor and Leiden herbaria. *Persoonia* 7: 55-118.
- Steyaert, R. L. (1975) The concept and circumscription of *Ganoderma tornatum*. *Transactions of the British Mycological Society* 65: 451-467.
- Steyaert, R.L. (1980) Study of some *Ganoderma* species. *Bull. bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* 50:135-186.
- Torrend, C. (1920) Les polyporacées du Brésil I. Le genre *Ganoderma*. *Brotéria Série Botânica* 18:23-43.
- Torres-Torres, M.G. & Guzmán-Dávalos, L. (2005) Notas sobre la variación morfológica en *Ganoderma curtisii* en México. *Revista Mexicana de Micología* 21: 39-47.
- Torres-Torres, M.G., Guzmán-Dávalos, L. & Gugliotta, AM. (2008) *Ganoderma viviamercedianum* sp. Nov. and related species *G. perzonatum*. *Mycotaxon* 105: 447-454.
- Torres-Torres, M.G. & Guzmán-Dávalos, L. (2012) The morphology of *Ganoderma* species with a laccate surface. *Mycotaxon* 119: 201-216.
- Torres-Torres, M.G., Guzmán-Dávalos, L. & Gugliotta, A.M. (2012) *Ganoderma* in Brazil. *Mycotaxon* 121: 93-132.
- Turner, P.D. (1981) *Oil Palm Diseases and Disorders*. Oxford University Press, UK.
- Vasco-Palacios, A.M. & Franco-Molano, A.E. (2013) Diversity of Colombian Macrofungi. (Ascomycota-Basidiomycota). *Mycotaxon* 121: 499.
- Vilgalys, R. & Hester, M. (1990) Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from several *Cryptococcus* Species. *Journal of Bacteriology* 4238 - 4246.
- Wang, D.M. and Yao, Y.J. (2005) Intrastrain internal transcribed spacer heterogeneity in *Ganoderma* species. *Canadian Journal of Microbiology* 51: 113-121.
- Wang, D.M., Wu, S.H. & Yao, Y.J. (2014) Clarification of the Concept of *Ganoderma orbiforme* with High Morphological Plasticity. *PLoS ONE* 9(5): E98733. <http://journals.plos.org/plosone/article>. Doi:10.1371/journal.pone.0098733

Wang, D.M. & Wu, S.H. (2009) *Ganoderma multipileum*, a correct name for 'G. lucidum' in tropical. *Botanical Studies* 50: 451-458.

Wang, X.C., Wu, K., Chen, H., Shao, J., Zhang, N., Chen, X., Lan, J. & Liu, C. (2015) The complete mitochondrial genome of the white-rot fungus *Ganoderma meredithiae* (Polyporales, Basidiomycota). Mitochondrial DNA. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (acesso em 10-Oct-2015).

Wang, X.C., Xi, R.J., Li, Y., Wang, D.M. & Yao, Y.J. (2012) The species identity of the widely cultivated *Ganoderma*, 'G. lucidum' (Ling-zhi), in China. *PLoS ONE* 7:40857.

Westphalem, M.C., Reck, M.A. & Borges da silveira, R.M. (2010) *Ganoderma chaliceum* and *Junghuhnia meridionalis*: new records from Brazil. *Mycotaxon* 3:11 -18.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.W. (1990) *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: M.A., Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, pp. 315–322.

Yeh, X.Y. (1999) *Taxonomy study of Ganoderma australe complex in Taiwan*. PhD Thesis. National Taiwan University.

Zhao, J.D. (1989) The Ganodermataceae in China. *Bibliotheca Mycologica* 132: 1-176.

Zhou, L.W., Cao, Y., Wu, S.H., Vlasak, J., Li, D.W., Li, M.J. & Dai, Y.C. (2014) Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (Ganodermataceae, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. *Phytochemistry* 114: 7-15.

Zhou, X.W., Cong, W.R., Su Q.K. & Zhang, Y.M. (2012) Ligninolytic enzymes from *Ganoderma* spp: current status and potential applications. *Critical Reviews in Microbiology* 1:111.

Legends of figures

Figure 1. Concatenate tree and reconstruction of the phylogenetic history of the sequences of *Ganoderma* species. Statistical support nodes include the maximum parsimony bootstrap, maximum likelihood and Bayesian respectively.

Figure 2. *Ganoderma australe*. A). Basidiomata. B). Context. C). Pores. D, E). Basidiospores

Figure 3. *Ganoderma gibbosum*. A). Basidiomata. B). Context. C). Pores. D, E). Basidiospores

Figure 4. *Ganoderma multiplicatum*. A). Basidiomata. B). Context. C). Cuticle cells. D.) Pores. E, F). Basidiospores

Figure 5. *Ganoderma subamboinense*. A). Basidiomat. B). Context. C). Cuticle cells. D.) Pores. E, F). Basidiospores.

Figure 6. *Ganoderma parvulum* complex. A). Basidiome. B). Context. C). Cuticle cells. D, E.). Basidiospores.

Figure 7. *Ganoderma* sp. A). Basidiomata. B). Context C). Pores. D). Cuticle cells. E, F). Basidiospores.

Legends of tables

Table 1. *Ganoderma* specimens collected in leguminous trees and dead stump.

Table 2. Sequences of *Ganoderma*, origin and references of used.

CAPÍTULO 2. New records of *Ganoderma multiplicatum* (Mont.) Pat. from Colombia and geographic distribution in South America

NGD

Ana Cristina Bolaños^{1,2*}, Vera Lúcia Ramos Bononi² and Adriana de Mello Gugliotta²

1 Universidad del Valle, Departamento de Biología, Calle 13 No. 100-00, Cali, Colombia.

2 Instituto de Botânica de São Paulo, Av. Miguel Stéfano, 3687, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author: ana.bolanos@correounivalle.edu.co

ABSTRACT

Ganoderma is a cosmopolitan genus which contains approximately 86 species distributed in temperate and tropical regions. The occurrence of species of *Ganoderma* in living leguminosae was observed in Park “de la Salud” in Pance, Cali, Colombia and *G. multiplicatum* is a species present and consistent and it was first mentioned for Colombia. A map with the distribution of this genus for the neotropical region is presented.

Key words: Ganodermataceae, Neotropical, Leguminosae, Taxonomy.

Introduction

The *Ganoderma* Karts. genus was created by P. Karsten in 1881 to recognize a lacquered and stipitate fungus *Polyporus lucidus* W. Curtis: Fr. type species of the genus (Moncalvo and Ryvarden 1997). *Ganoderma* is well circumscribed by the truncated, ellipsoid basidiospore with apical germinal pore, double-ornamented walls: the external wall (exosporium) is thin and hyaline, and the internal wall (endosporium) is dark brown, separated with internal crests (Ryvarden 2004). Due to the high phenotypical plasticity found in the basidiomata of this genus and the several concepts of the species, identifying some species has been confusing and a correct geographical distribution is still pending (Moncalvo and Ryvarden 1997). In Colombia, *Ganoderma* has not been studied in depth; however, studies based on morphology mention the existence of *G. australe*, *G. adspersum*, *G. amazonense*, *G. applanatum*, *G. brownie*, *G. chalceum*, *G. concinnum*, *G. fornicatum*, *G. lucidum*, *G. nitidum* and *G. neurosporum* (Ryvarden 2004, Vasco-Palacios and Franco-Molano 2013).

Ganoderma multiplicatum originally was collected in French Guyana on trunk (Moncalvo and Ryvarden 1997). This species has been considered very much alike *G. chalceum* (Corner 1983). Ryvarden (2000) considered it a synonym to *G. subamboinense*, but a recent phylogenetic paper written by the authors (unpublished data) shows that it is actually *G. multiplicatum*.

Material and methods

During a search of species of *Ganoderma* in living leguminosae and in rotten logs in urban and rural areas, we collected a basidiome of *G. multiplicatum* at Park “ de la Salud” (3° 19′ 42” N, 76° 38′ 19” W) Cali-Colombia. The collection was performed accordingly to Fidalgo and Bononi (1984). For analysis of morphological characters thin sections of basidiome were prepared and treated with 4%KOH, 1% Phloxine and Melzer reagent (Ryvarden 2004).The vouchers are deposited in SP and CUVCHerbaria.

Identification

***Ganoderma multiplicatum* (Mont.) Pat.**, Bull. Soc. Mycol. Fr. 5:74, 1889.

≡ *Polyporus multiplicatus* Mont., Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. 4, 1:128, 1854.

Figures 1- 9.

This species has been recognized because it presents dimidiate basidiomata, 14x10x3cm, lacquered, pale light brown to reddish brown, slightly protuberant cells of the amyloid cuticle and basidiospores 8.4 x 5.8µm.

Specimen examined: Colombia: Cali, Dept. Valle, Park de la Salud Pance, 05.I.2013. A.C. Bolaños (CUVC60077).

Additional specimens examined: Brasil. São Paulo, SP417797, SP417778, SP417780; Guyana Francesa, K123639 LECTOTYPE.

Discussion

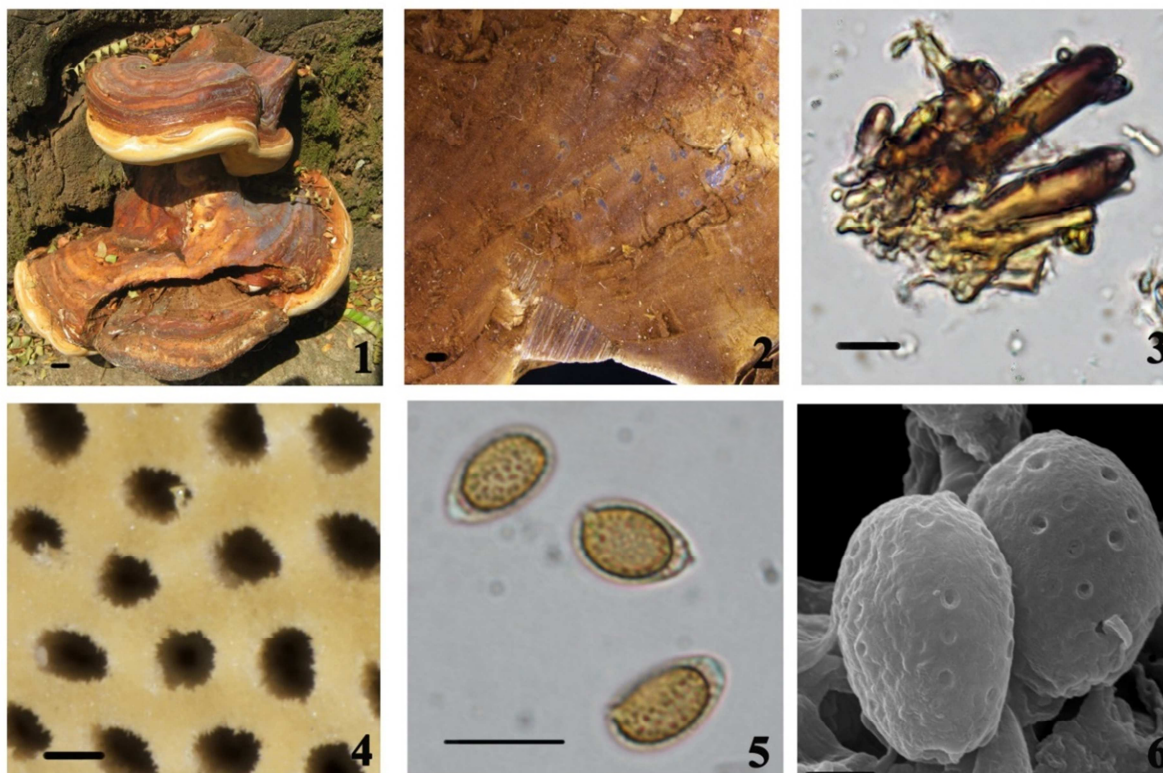
G. multiplicatum is a species with Neotropical distribution (Steyaert 1980), cited in Venezuela (Ryvarden 2004). In Brazil it has been described in São Paulo (Gugliotta et al. 2011), Santa Catarina (Loguercio-Leite et al. 2005, Drechsler-Santos et al. 2008, Baltazar and Gibertoni 2009), Amazonas, Pará and Rondônia (Gomes-Silva and Gibertoni 2009), Roraima (Gomes-Silva et al. 2011), Rio de Janeiro (Gugliotta and Abrahão 2012), Alagoas and Sergipe (Torres-Torres et al. 2012), Paraíba (Lima et al. 2014) and Mato Grosso do Sul (Quevedo et al. 2012). In Argentina this species has been mentioned in Tucuman, Corrientes and Chaco (Gottlieb and Wright, 1999). List of localities with their geographic coordinates are on table 1.

Table 1. Geographic Coordinates and references

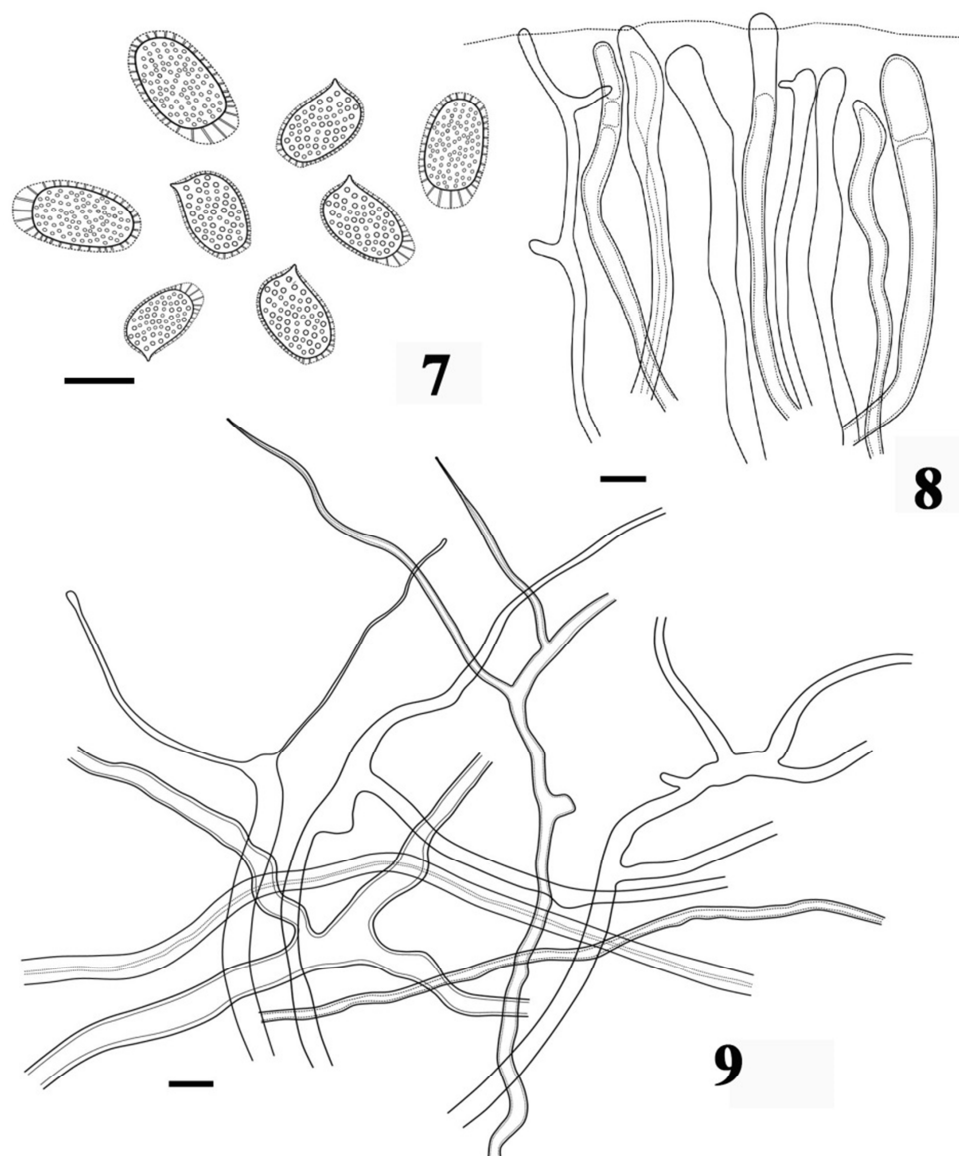
Country	Locality	Coordinate	Reference
Argentina	Corrientes	27° 28' 9''N, 58° 49' 50''W	Gottlieb and Wright 1999
	Chaco	26° 14' 3''N, 60° 46' 55''W	Gottlieb and Wright 1999
	Tucuman	26° 49' 20''N, 65° 13' 9'' W	Gottlieb and Wright 1999
Brazil	Amazonas	3° 25' 0.6''N, 65° 51' 22''W	Gomes-Silva and Gilbertoni 2009, Torres-Torres et al. 2012
	Alagoas	9° 34' 17''N, 36° 46' 55''W	Torres-Torres et al. 2012
	Mato Grosso do Sul	20° 46' 20''N, 54° 47' 66''W	Quevedo et al. 2012
	Para	1° 59' 53''N, 54° 55' 50''W	Gomes-Silva and Gilbertoni 2009
	Rio de Janeiro	22° 54' 2''N, 43° 10' 22''W	Torres-Torres et al. 2012
	Paraíba	7° 17' 50''N, 36° 37' 3''W	Lima et al. 2014
	Rondônia	11° 30' 21''N, 63° 34' 50''W	Gomes-Silva and Gilbertoni 2009, Torres-Torres et al. 2012, Lima et al. 2014
	Roraima	2° 44' 15''N, 62° 4' 30''W	Gómez-Silva et al 2011
	Santa Catarina	27° 14' 32''N, 50° 13' 8''W	Drechsler-Santos et al. 2008, Baltazar and Gibertoni 2009, Loguercio-Leite et al. 2005.
	São Paulo	23038'00''S- 23040'18''S e 46036'48''-46038'08''W	Gugliotta et al. 2011, Torres-Torres et al. 2012
	Sergipe	10°34'27''N, 37° 23' 8'' W	Torres-Torres et al. 2012
Colombia	Cali Pance	3° 19' 42'' N, 76° 38 '19'' W	The authors
Guyana Francesa	Isla Principe	3° 56' 2''N, 53° 7' 33''W	Moncalvo and Ryvarden 1997
Venezuela		10° 27' 58''N, 66° 54' 4''W	Ryvarden 2004

*Data not informed by the author. Were considered the coordinates of the locality or municipality.

This is the first record of the species for Colombia and contributes to increase the list of species of the genus for the country and for the Neotropic. The type material from French Guyana (South America), is in Kiew herbarium (K), and it consist of a basidiome fragment. Nevertheless, the material allowed the identification of material collected. Despite of originally described to South America, this species was registered in Tahiti, New Guinea, Egypt and United States / Washington (Lloyd 1915), Africa and India (Steyard 1980) and in Hainan Island (Zhao 1989). A distribution map for the Neotropic of *G. multiplicatum* is shown in Figure 10.



Figures 1-9. *Ganoderma multiplicatum* (Mont.) Pat. 1). Basidiomata (Scale bar = 2cm). 2). Context (Scale bar = 1mm). 3). Cuticle cells (Scale bar = 10 μ m). 4). Pores (Scale bar = 10 μ m). 5-6). Basidiopores (Scale bar = 10 μ m, Scale bar = 2 μ m respectively).



Figures 7-9. *Ganoderma multiplicatum* (Mont.) Pat. 7. Basidiospores. 8. Cuticle cells. 9. Skeletal hyphae. (Scale bar = 5 μ m).

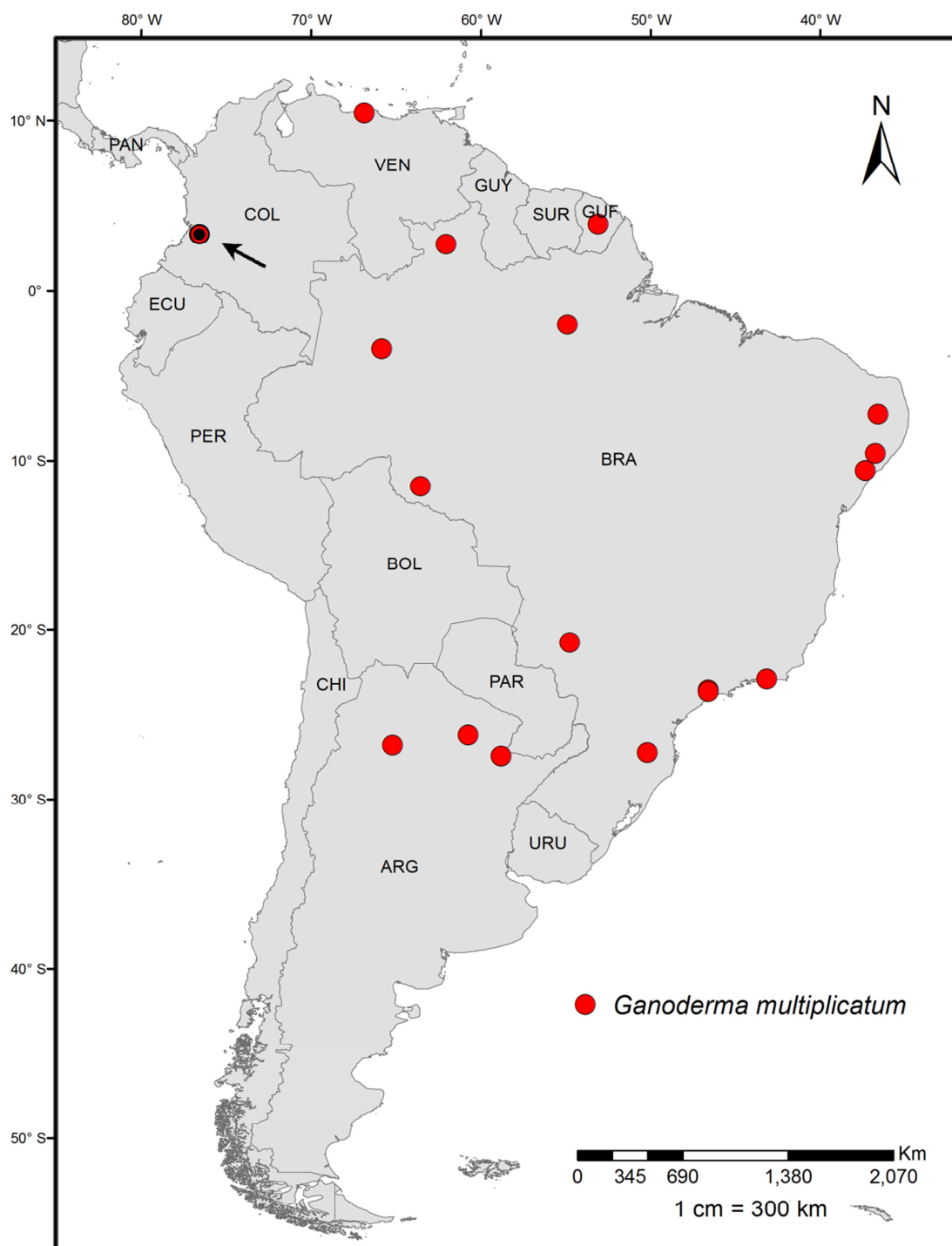


Figure 10. Geographical distribution map of *G. multiplicatum* (Mont.) Pat. in the neotropics.

Acknowledgements

The authors thanks SP and CUVV herbaria for facilitating the equipment to study the material. To FAPESP and Universidad del Valle for the financial support granted. We Thanks Viviana Motato for the illustration figure.

Literature cited

- Baltazar, J.M. and T.B. Gibertoni. 2009. A checklist of aphyllorphoroid fungi (*Basidiomycota*) recorded from the Brazilian Atlantic rain forest. *Mycotaxon* **109**: 439- 442.
- Corner, E.J.H. 1983. Ad Polyporaceas I. *Amauroderma* and *Ganoderma*. Beheft. *Nova Hedw.* 75: 1-182.
- Drechsler-Santos, E.R., C. Groposo, and C. Loguercio-Leite. 2008a. Additions to the knowledge of lignocellulolytic Basidiomycetes (Fungi) in forests from Santa Catarina State, Brazil. *Mycotaxon* 103: 197–200.
- Fidalgo, O. and V.R.L. Bononi. 1984. Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. São Paulo:Instituto de Botânica. 62pp
- Gomes-Silva, A.C. and T.B. Gibertoni. 2009. Checklist of the aphyllorphoraceous fungi (*Agaricomycetes*) of the Brazilian Amazonia. *Mycotaxon* **108**: 319-322.
- Gomes-Silva, A.C., L. Ryvardeen, and T.B. Gibertoni. 2011. New records of Ganodermataceae (*Basidiomycota*) from Brazil. *Nova Hedwigia* 92: 83–94.
- Gottlieb, A.M. and, J.E. Wright. 1999. Taxonomy of *Ganoderma* from Southern South América: Subgenus *Ganoderma* *Mycol. Res.* 103: 1289-1289.
- Gugliotta, A. M. and M. C. Abrahão. 2012. Polyporales. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico - Rio de Janeiro (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB092934>).
- Gugliotta, A. M., G.D. Poscolere, and T.V. Silva. 2011. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brazil. *Fungos*, 10: Ganodermataceae. *Hoehnea* 38(4): 687-695.
- Karsten, P.A. 1881. Enumeratio Boletinearum et Polyporearum Fennicarum, Systemate Novo Dispositarum. *Rev. Mycol.* 3:16-19.
- Lima, N.J., G. Baptista and E. Malosso. 2014. Delimitation of some neotropical laccate

- Ganoderma* (Ganodermataceae): molecular phylogeny and morphology. *Revista de Biología tropical* 62:1197-1208.
- Loguercio-Leite C., C. Groppo and M.A. Halmenschlager. 2005. Species of *Ganoderma* Karsten in a subtropical area (Santa Catarina State, Southern Brazil). *Iheringia, Bot.* 60(2):135–139.
- Lloyd, C. G. 1915. Synopsis of the genus *Fomes*. *Mycological Writings* 4, 209-288.
- Moncalvo, J-M. and L. Ryvarden. 1997. A nomenclatural Study of the Ganodermataceae Donk. *Synopsis Fungorum* 11, Oslo:Fungiflora. 114p.
- Quevedo, J., V.L. Bononi, A.K.M. Oliveira and A.M. Gugliotta. 2012. Agaricomycetes (Basidiomycota) em um fragmento florestal urbano na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Bioci.*, 10:430-438.
- Ryvarden, L. 2000. Studies in neotropical polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia*, 92:180-19.
- Ryvarden, L. 2004. Neotropical Polypores: Part 1. Introduction, Ganodermataceae & Hymenochataceae. Oslo:Fungiflora.
- Steyaert, R.L. 1980. Study of some *Ganoderma* species. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 50:135- 186.
- Torres-Torres, M.G., L. Guzmán-Dávalos and A.M. Gugliotta. 2012. *Ganoderma* in Brazil. *Mycotaxon* 121: 93-132
- Vasco-Palacios, A.M. and A. E. Franco-Molano. 2013. Diversity of Colombian Macrofungi. (Ascomycota-Basidiomycota). *Mycotaxon*, 121, 499.
- Zhao, J.D. 1989. The Ganodermataceae in China. *Bibliotheca Mycologica* 132:1-176.

Author contribution

ACB Collected the sample, wrote the text and made the analysis; **VLB, AMG** wrote the text.

Received:

Accepted:

Academic editor:

Figure caption

Figure 1-6. *Ganoderma multiplicatum* (Mont.) Pat. 1). Basidiomata (Scale bar = 2cm). 2). Context (Scale bar = 1mm). 3). Cuticle cells (Scale bar = 10µm). 4). Pores (Scale bar = 10µm). 5-6). Basidiopores (Scale bar = 10µm, Scale bar = 2µm respectively).

Figure 7-9. *Ganoderma multiplicatum* (Mont.) Pat. 7. Basidiospores. 8. Cuticle cells. 9. Skeletal hyphae. (Scale bar = 5 µm).

Figure 10. Geographical distribution map of *G. multiplicatum* (Mont.) Pat., in the neotropics.

CAPÍTULO 3. Ligninolytic enzymes activity in saprophyte and parasite species of *Ganoderma*

Bolaños, A.C.^{1,2}; Bononi, V.R.L.²; Vitali, V. M.²; Gugliotta, A.M.²; Almeida, A.G.².

1. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, calle 13 No. 100-00, Cali – Colombia.
2. Instituto de Botânica, Núcleo de pesquisa em Micologia. Av. Miguel Stéfano 3687, São Paulo, Brasil.

Corresponding author. Tel. + 57 2 3393243

E-mail address: ana.bolanos@correounivalle.edu.co

Abstract

Ganoderma are polypore fungi with saprophytes and parasite species reported in temperate and tropical areas. Basidiomata of *Ganoderma australe*, *G. applanatum-australe complex*, *G. multiplicatum*, *Ganoderma* sp. and *G. subamboinense* were collected from ornamental leguminous trees at avenues and rotten logs in green areas and parks in Neotropical countries (São Paulo/Brazil and Cali/Colombia). Three treatments: sawdust of *Caesalpinia peltophoroides* plus water, sawdust plus malt extract and one treatment of liquid malt extract medium were prepared to evaluate the production of ligninolytic enzymes. Laccase and phenoloxidase were produced on substrates by parasitic and saprophytic strains. Manganese Peroxidase is produced in one parasitic strain when cultivated in sawdust, but it occurs in both saprophytic and saprobic strains when growing in malt extract liquid medium. Lignina peroxidase was not detected. Most parasitic species (66%) showed ligninolytic enzymes' activity higher than that in saprophytic species.

Keyword: white-rot fungus, Lacase, Ganodermataceae, Manganese and lignina peroxidase.

Introduction

The genus *Ganoderma* Karst. has been broadly studied in recent years under taxonomic aspects (Cao et al., 2012, Zhou et al., 2015), production of extracellular ligninolytic enzymes (Zhou et al., 2012), metabolites with potential medicinal use (Bishop et al., 2015) and because some species can cause serious diseases, such as plant pathogens bearing economic interest (Naher et al., 2013).

Ganoderma species grow under fallen logs, such as those of saprophytes, or on different types of trees and domesticated plants, where it becomes a dangerous pathogen (Sankaran et al., 2005, Hushiarian et al., 2013). While the wood is colonized, the fungi produce ligninolytic enzymes which degrade the lignocellulose present in the plant cellular wall (Adaskaveg and Gilbertson, 1986). *Ganoderma* species and other species of polypore are categorized as white-rot fungi and deemed one of the most efficient groups to degrade α -C β , β -aryl, C₁-C α bonds, degrading including C-C bonds (Kirk, 1981; Chen et al., 1982) transforming lignin up to CO₂ and H₂O (Hatakka, 1994). The capacity to degrade lignin is one of the most important biological reactions in nature due to its environmental implications and possible biotechnological applications (Eriksson and Bermek, 2009).

In addition to the white-rot fungi, two other groups of fungi are involved in degrading lignin: brown-rot fungi which, through a fenton reaction degrade polysaccharides and leave lignin intact, and the soft-rot fungi, whose function has not been fully clarified (Hatakka, 1994).

Recent genome studies have shown that white-rot fungi have more genes that codify for hydrolytic and oxidizing enzymes than brown-rot fungi. Genome of species *Botryobasidium botryosum*, *Jaapia argillacea*, and *Schizophyllum commune* deviate from the classical white-rot model because they lack peroxidase (PODs), but they have enzymes that act on crystalline cellulose (Riley et al., 2014).

In lignin degradation, white-rot fungi produce four types of ligninolytic enzymes: lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), laccase (LaC) and versatile peroxidases (P). The latter group mixes functional and structural properties of MnP and LiP and little is known of the gene's structure and of the region promoting this type of enzyme (Janusza et al., 2013).

In several species of the *Ganoderma* genus the production of laccase has been reported, in addition to manganese peroxidase, lignin peroxidase and versatile peroxidases in fermented agro-industrial residues supplemented with different sources of carbon, nitrogen or in wood splinters of *Eucalyptus* spp.; *Poplar* sp. and *Drimys winteri*. Not always is the enzyme production equal for all species, strains, age and conditions of culture (D' Souza et al., 1999; Silva et al., 2005; Elissetche, 2007; Songulashvili et al., 2007; Simonić et al., 2010; Mehboob et al., 2011; Hariharan and Nambisan, 2013). Laccase is one of the main enzymes cited for many species of white-rot fungi (Wong, 2009), plants and insects (Mayer, 1987; Mayer and Staples, 2002) and bacteria (Diamantidis et al., 2000; Hullo et al., 2001; Sánchez-Amat et al., 2001).

Laccase production as the main phenoloxidase has been detected in culture of *Pycnoporus cinnabarinus* in agar and lignosulphonate at 1%; the activity of peroxidase triggered by ABTS oxidation in the presence of H₂O₂ has been stimulated by low levels of Nitrogen (Eggert et al., 1996).

The importance of the ligninolytic enzymes produced by *Ganoderma* and other white-rot fungi can be calculated because they can be used to treat several lignocellulosic materials generated by the food, paper, textile and dye industries, by agricultural activities, accumulation at municipal dumps and in bioremediation processes of toxic substances, where benefits are obtained in return once those processes are more environmentally-friendly (Akhtar et al., 2000; Huang and Cheng, 2000; Pokhrel, 2005; Wang, 2009; Manavalan et al., 2012). The main objective of this paper was to study ligninolytic enzymes of saprophyte and

parasite species of *Ganoderma* involved in degradation and fall of species of leguminous plants used in urban trees.

MATERIAL AND METHODS

Fungal specimens

Basidiomata of different species of *Ganoderma* were collected in leguminous plants affected and fallen trunks in urban and protected areas in Brazil and Colombia. Mycelium was isolated of each basidiome and preserved in malt extract agar (MEA) at 2% for enzymatic analysis. The basidiomata and fertile samples of the hosting trees were dried and stored for taxonomic studies. The list of the species collected can be found in table 1. The species were identified accordingly to the traditional taxonomy and confirmed through molecular biology (Bolaños et al., 2016)

Table 1. *Ganoderma* specimens collected in leguminous trees and dead stump

Species	Origin	Collection Number	Host
<i>G. australe</i>	Brazil	SP417784(CTRA-3)	Dead stump
		SP417796 (CTRA-11)	Dead stump
		SP417793 (CTRA-12)	Dead stump
		SP417774(SPC-2)	<i>Inga vera</i> Willd
<i>G. applanatum-australe</i> complex	Brazil	SP417798(SPC-7)	<i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth.
		SP417781(IBT-3)	Dead stump
		SP417788(CTRA-8)	Dead stump
<i>G. multiplicatum</i>	Brazil	SP417797(SPC-5)	<i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth.
		SP417780(IBT-2)	Dead stump
<i>Ganoderma</i> sp.1	Colombia	CUVC60081 (CC-12)	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit
		CUVC60084 (CC-15)	<i>Cassia fistula</i> L.
		CUVC60087(CC-18)	<i>Phitecelobium dulce</i> (Roxb.) Benth.
<i>G. subamboinense</i>	Brazil	SP417773(SPC-1)	<i>Caesalpinia ferrea</i> C. Mart.

Inoculum and culture

a) Growth in petri dish and inoculum

Each strain isolated grew for 7 days in petri dish with MEA (2%). The inoculum was composed with 20 mycelium disks of 5-mm which were introduced in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml liquid malt extract (ME) and incubated at 28°C for seven days. Later, the same liquid and the mycelium mass obtained were blended for 45 seconds at 15-second intervals; 2.5 ml was used to inoculate the substrate.

b) Substrates and inoculation

Leguminous plants were identified by taxonomists of the Prefecture of São Paulo and of Universidad del Valle in Colombia. Sibipiruna sawdust (*Caesalpinia peltophoroides* Benth) was used to assess the production of ligninolytic enzymes of the twelve strains of *Ganoderma*, this plant being chosen because it is a leguminous where *Ganoderma* species are more frequently found. Two treatments were made: sawdust + 70% water and sawdust + malt extract liquid medium; for each treatment 5.652g of dry sawdust material were added in sterile 250ml flasks, sterilized for one hour and, after they had cooled down, they were inoculated with 2.5ml of mycelium of each strain blended for 3 times during 15 seconds (Elissetche et al., 2007). Each treatment was replicated 5 times.

c) Cultivation in malt extract liquid medium at 2%

Liquid malt extract at 2% (20g malt extract, 20g glucose, 1g bacterial peptone for 1000 ml of distilled water) was prepared, inoculated with the same strains of *Ganoderma* and incubated for 14 days at 28°C. Inoculum was obtained with 20 disks of mycelium of 5mm diameter grown with 7 day incubation. At seven day intervals enzymatic readings were done.

Enzyme extraction

After growing for seven days, enzymes were extracted by adding 40ml of a buffer of 50mM sodium acetate pH 4.8 to each flask with inoculum (Simonić et al., 2010). The set was agitated for one hour in an agitating table at 120 rpm. Later filtering was done in a vacuum pump and the extract was collected in tubes, was treated with activated coal to reduce color,

varying the proportion from 1 to 20% coal per volume of extract, agitated for 30 minutes (Carvalho et al., 2008), filtered with 0.45 micrometer Millipore membrane and centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes.

Determining enzymatic activity

Spectrophotometric determination of laccase enzymes and phenoloxidase was done through ABTS oxidation ($\epsilon_{420}=3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The mix of the reaction for laccase was done in 1ML cuvettes containing 0.6ml enzymatic extract with 50 μ l catalase, allowed to rest for 10 min. Next, 250 μ l phosphate citrate buffer pH4.0 and 100 μ l 50mM ABTS were added. Reading was done at 420nm (Bourbonnais & Paice 1988). For the phenoloxidase the mix of the reaction contained 0.6ml enzymatic extract, 250 μ l phosphate citrate buffer pH 4.0, 50 μ l hydrogen peroxide and 100ul ABTS.

Activity of manganese peroxidase was determined by oxidation of 0.7Ml mM phenol red ($\epsilon_{610}=4460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The mix of the reaction was done in 3Ml cuvettes containing 2.1ml buffer solution of 0.2M sodium succinate, pH 4.5, 0.1M sodium lactate and 0.5% bovine albumin 0.35ml MnSO₄ 2mM, 0.35ml hydrogen peroxide 2mM and 3.5ml enzymatic extract. Readings were done for 10 minutes. Every 2 minutes 1ml of reaction was removed; the reaction got paralyzed with 50 μ l NaOH 2N. Readings were done at 610nm (Kuwahara et al., 1984).

To determine enzymatic activity of lignin peroxidase, oxidation of 500 μ l 10mM veratryl alcohol ($\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was found. The reaction was mixed in 3Ml cuvettes containing 1ml 125mM sodium tartrate buffer pH 3.0, 500 μ l 2mM hydrogen peroxide and 500 μ l enzymatic extract (Tien and Kirk, 1984). Reading was done through spectrophotometry at 310nm wave length.

Ionic exchange column DEAE sepharose CL-6B

A 17cm x 1.2cm glass column was filled up with 75% DEAE Sepharose CL-6B resin and 25% of 50mM sodium acetate buffer pH 4.8. The resin had been balanced and air had been removed from the column. After the resin had sedimented in the column, it was connected by gravity to eluent 50mM sodium acetate pH 4.8 and the flow set at 0.5-0.7ml/min. The enzymatic extract had its pH adjusted at 4.8, with 2M acetic acid, next 2ml of sample was placed at the top of the column and elution was done with 0.2M NaCl solution buffered with sodium acetate pH 4.8. Fractions were collected and read in the spectrophotometer at 280nm to determine MnP and LiP (Carvalho et al., 2008).

Statistical analysis

The statistical treatment rendered to the data was done in the SAS program through a factorial analysis having as factors the strains and the culture media. Variance analysis was done to check significant differences among strains, culture media and strain-medium interaction, and the Tukey test comparing the means of the squared minimum of the strain-medium interaction.

Results and discussion

Five taxa of *Ganoderma* were identified in 6 species of leguminous plants. This is the first study of enzymatic activity of *G. multiplicatum* and *G. subamboinense*. Three strains did not grow in neither of the two culture media evaluated (SP417796 or CTRA-11, SP 417788 or CTRA-8 and CUVC60087 or CC-18).

Ligninolytic activity of saprophyte and parasite strains of *Ganoderma* in treatments with sibipiruna sawdust

The species *G. australe*, *G. applanatum-australe* complex, *G. multiplicatum*, *G. subamboinense* and *Ganoderma* sp. cultivated in sawdust with water and sawdust with malt extract at 2% (ME) only presented ligninolytic enzymatic activity of phenoloxidases and

laccases (Figures 1, 2, 3 and 4). Studies conducted with *G. australe* and *G. lucidum* in cultivation with sawdust of *Drimys winteri*, *Eucalyptus globulus* and *Liriodendron tulipifera*, also presented activities only of laccases (D'souza et al., 1999; Elissetche et al., 2007). Just in one parasite strain of *Ganoderma* sp. (CC-12) MnP activity was detected in the two culture media after 14 days of incubation (sawdust with water - 30U/L; sawdust with Me -50U/L; $p < 0,05$). D'Souza et al. (1999) obtained similar result when they studied *G. lucidum* incubated in several types of sawdust and only in the cultivation with *Populus alba* (Poplar) did they obtained activity of MnP (103 u/L).

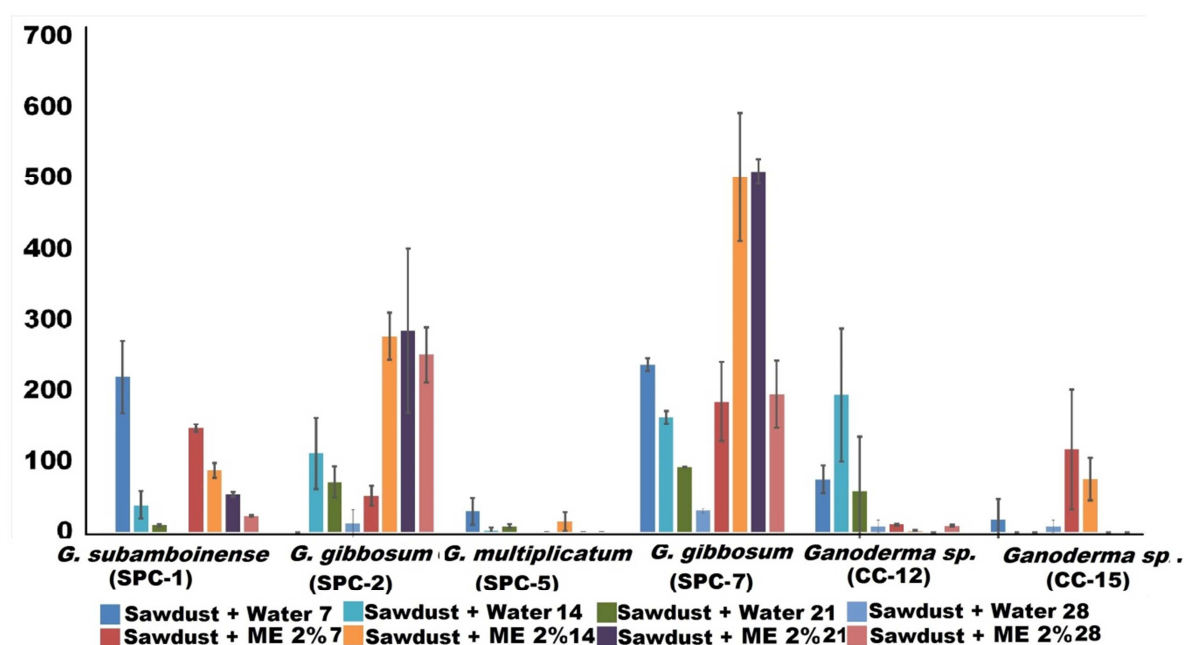


Figure 1. Phenoloxidase production in parasite species of *Ganoderma* in the 7, 14, 21, and 28 days of incubation.

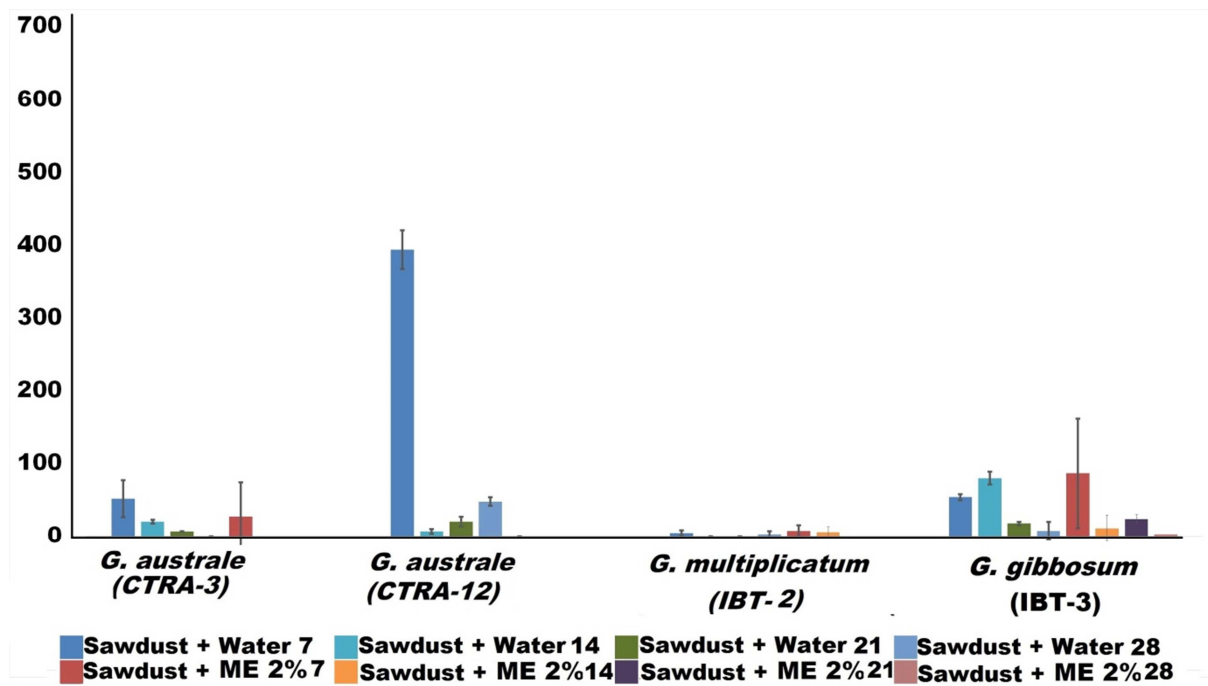


Figure 2. Phenoloxidase production in saprophyte strains of *Ganoderma* in the 7, 14, 21, and 28 days of incubation.

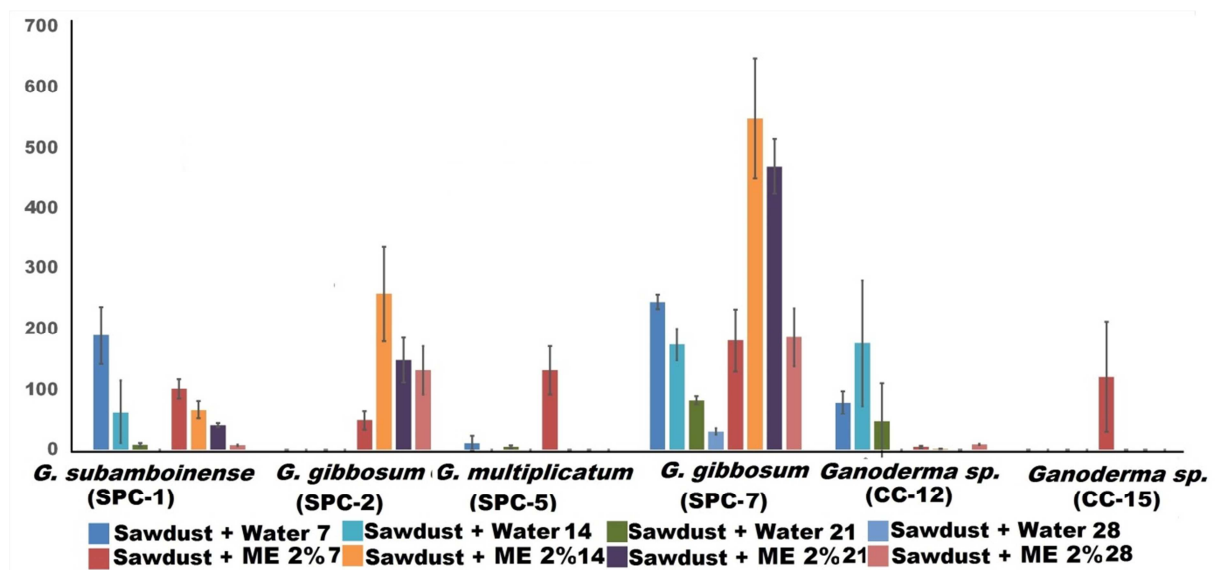


Figure 3. Laccase production in parasite strains of *Ganoderma* in the 7, 14, 21, and 28 days of incubation.

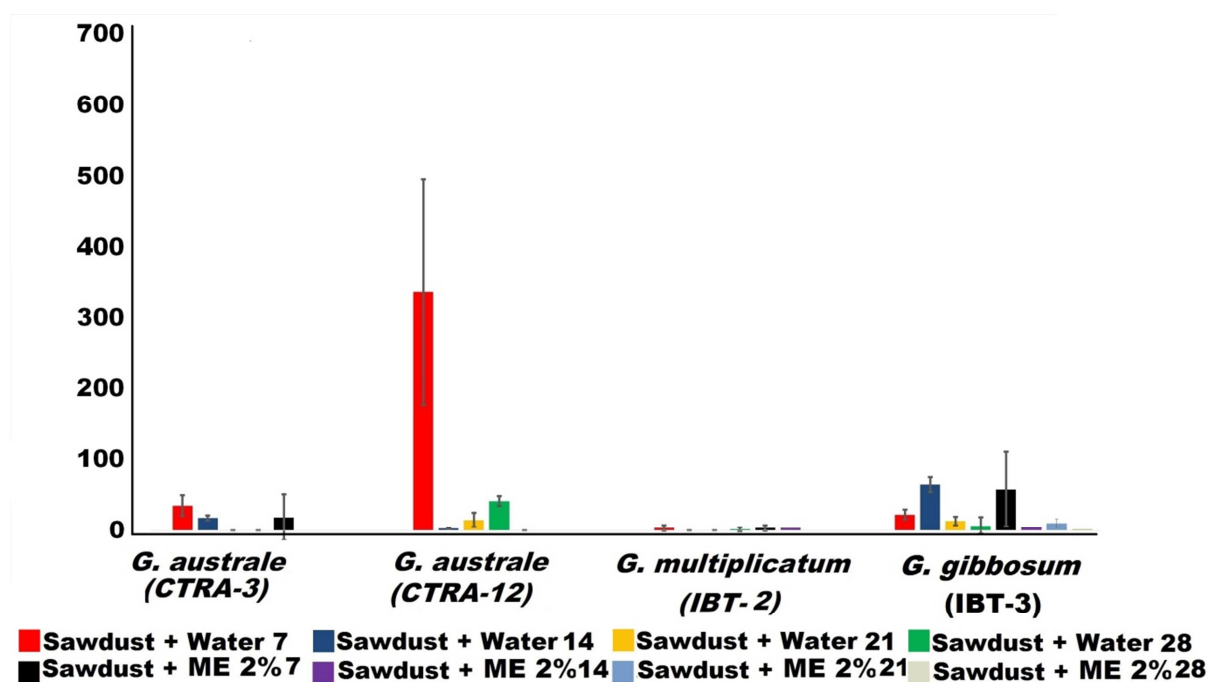


Figure 4. Laccase production in saprophyte strains of *Ganoderma* in the 7, 14, 21, and 28 days of incubation.

In the remaining strains studied the extracts obtained made the reading of MnP and LiP strains difficult because they had a very dark color. Studies have stated that the origin of dark color is related to the formation of aromatic compounds derived from degradation of lignocellulose material (Data et al., 1991; Vares et al., 1995, Carvalho et al., 2008). Failure in recording those enzymes can also be due to the presence of peroxidase inhibitors or yet due to the low production of enzymes. To clean and whiten the extracts a treatment with coal at 2% was used and it was concentrated in the ionic exchange column with the DEAE sepharose CL-6B resin. However, the results were negative for these two enzymes. Difficulties in determining enzymatic activity of LiP have also been cited for *Ganoderma lucidum* (D'Souza et al., 1999) and for other species, such as *Trametes versicolor* (Valmaseda et al., 1991), *Ceriporiopsis subvermispora* (Lobos et al., 1994) and *Phebia radiata* (Tamara et al., 1995). Batool et al. (2013) obtained an increase in the LiP activity up to 1.019 IU/ml for *G. lucidum*

when cultivated with wheat straw, thus improving the carbon/nitrogen relation, adding inducers and optimizing physical conditions.

Using activated coal to whiten the extract also captures the enzymes present. To confirm the production of MnP by the strains, once they were found in *Ganoderma* sp. 1 CC-12, all strains were cultivated in liquid medium of malt extract at 2%. MnP activity was detected in *G. australe* (CTRA-12), *G. multiplicatum* (SP-C5, IBT-2), *G. applanatum-australe* complex (SPC-2, SPC-7), *Ganoderma subamboinense* (SPC-1) and *Ganoderma* sp. 1 (CC-12). All these strains presented activity mainly on day 14 of incubation. Enzyme production varied with the strains (0.2 to 18.5 U/L) (Table 2).

In this article significant heterogeneity in the production of ligninolytic enzyme by the different *Ganoderma* strain will be found in the culture media assessed. Several papers have stressed that said behavior depends on the species (Songulashvili *et al.*, 2007), on the origin of the strains (Silva *et al.*, 2005), type of substrate, cultivation conditions (Elissetche *et al.*, 2007), and on the type of growth (Rajendran *et al.*, 2008).

In this study specimens were collected under saprophyte and parasite conditions. In the complex *Ganoderma applanatum-australe*, strains SPC-2 and SPC-7 are parasites and presented more enzymatic activity in the medium of sawdust substrate wetted with malt extract. In this culture medium enzymatic activity of these strains varied approximately 52-285 and 184-500 (U/L) respectively, for phenoloxidase, while laccase varied from 49 to 250 and from 181 to 549 (U /L) for SPC-2 and SPC-7. SPC-7 specimen presented higher activity where laccase predominated on days 14 and 21, varying from 470 to 550.

Table 2. Manganese peroxidase (MnP) produced by *Ganoderma* specimens cultivated in malt extract liquid medium.

species	strains	Host	Manganese peroxidase (days)	
			7	14
<i>G. australe</i>	SP417784(CTRA-3)	Dead stump	0	0
	SP417793(CTRA-12)	Dead stump	0	3.7
<i>Ganoderma applanatum-australe</i> complex	SP417781(IBT-3)	Dead stump	0	18.5
	SP417774(SPC- 2)	<i>Inga vera</i>	0	0
	SP417798(SPC-7)	<i>C. peltophoroides</i>	0	2.5
<i>G. multiplicatum</i>	SP417780(IBT-2)	Dead stump	0.01	0.2
	SP417797(SPC-5)	<i>C. peltophoroides</i>	1.2	1.4
<i>G. subamboinense</i>	SP417773(SPC-1)	<i>C. ferrea</i>	0	0
<i>Ganoderma</i> sp. 1.	CUVC60081 (CC-12)	<i>L. leucocephala</i>	1.2	2.8
	CUVC60087 (CC-15)	<i>C. fistula</i>	0	0

SP417781 (IBT-3) saprobic fungus specimen presented low enzymatic activity (80U/L) in the two cultivations assessed, sawdust wetted with water or with malt extract. Statistical differences in enzyme production were significant ($p < 0.05$). So, it is possible to assume that the strains coming from parasites are stimulated by compounds supplied by the tree alive while those coming from saprophytes do not respond to a richer medium.

The same behavior was presented by *G. australe* SP417784 (CTRA-3) isolated under saprophyte condition, which presented low activity in the two culture media. SP417793(CTRA-12) saprophyte strain did not present enzymatic activity in the medium enhanced with malt extract; activity in the medium of sawdust with water was much higher than that of the other strains of the same species (phenoloxidase 390 U/L and laccase 340U/L – $P < 0.05$). Said

variation may indicate their adaptation to limiting conditions of carbon and nitrogen, once it is reported as occurrence only as saprophyte. Several studies have mentioned that there is a broad diversity of responses as to source and concentration of carbon required to the production of laccase, and that some carbohydrates seem to regulate that expression (Wang et al., 2008; Elisashvili and Kachlishvili, 2009). Studies have also cited that as to the need of nitrogen the responses vary, some species produce ligninolytic enzymes in its absence, other species produce at high concentration, and yet for other species it does not matter whether the medium has high or low concentration of nitrogen (Levin and Ramos, 2010).

For the species *Ganoderma multiplicatum* the parasite or saprophyte conditions does not interfere with its enzymatic production.

In *G. subamboinense*, a parasite strain (SPC-1), it produces phenoloxidasas (220 U/L) and laccases (190 U/M) in medium with sawdust and water with stronger activity on the first days, while in the medium enhanced with malt extract, activity was weaker on day 7 of incubation, but stronger activities occurred in the rest of the period ($P < 0.05$).

Ganoderma sp. collected in Colombia, with parasite strains CC-12 e CC-15, presented a quite different behavior related to the two media; CC-12 responded better to the medium of sawdust with water, while CC-15 presented the same pattern of the parasite strains of the complex *applanatum-australe* and *G. subamboinense*.

Generally speaking, the enzymatic response of parasite strains to cultivations with sawdust wetted with malt extract present larger and better distribution of the ligninolytic activity during the incubation period.

On the other hand, saprophyte strains that grew in sibipiruna substrate, different from the natural substrate where they had been found, presented low ligninolytic activity related to the parasite strains, except for strain CTRA12. It is probable that the penetration of hyphae in this substrate or the presence of inhibitors in this wood have influenced enzymatic activity.

Studies of natural degradation of *G. australe* in the ecosystem of rotten logs showed that enzymatic activity in sawdust of rotten wood wetted with water did not have enzymatic activity, while that same sawdust extracted had enzymatic activity for Mn peroxidase (Ríos & Eyxaguirre 1992). Up to this date no references to enzymatic behavior among saprophyte and parasite strains have ever been made.

Both parasite strains from Colombia (CC-12 and CC-15) presented enzymatic activity different from those from Brazil and also different related to each other, thus suggesting that they are different related to the conditions for enzyme phenoloxidasas as to their expression, and that the geographical origin of the species can interfere with the enzymatic activity; MnP enzyme was identified in a strain of the species (CC-12) from Colombia.

Acknowledgement

Authors thank Fapesp and Universidad del Valle for their financial support. We thank the Prefecture of São Paulo for facilitating the collection of specimens and for providing the previous identifications of the material. We also thank Dr. Edson Paulo Chu, Luce Maria Brandão Torres, of the Physiology and biochemical department, for his support to assemble and operate the ionic exchange column, and Myriam Cilene Spasiani Rinaldi, of Ecology department, for her help.

Literature cited

Adaskaveg, J.E. & Gilbertson, R., 1986. In vitro decay studies of selective delignification and simultaneous decay by the white rot fungi *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. Can. J. Bot. 64, 1611-1619.

Akhtartt, G.M., Swaney, R.E., Shipley, D.F., 2000. Biomechanical pulping: a mill-scale evaluation. Resour Conserv Recy. 28, 241-252.

- Batool, S., Asgher, M., Sheikh, M.A., Rahman, S.U., 2013. Optimization of physical and nutritional factors for enhanced production of lignin peroxidase by *Ganoderma lucidum* in solid state culture of wheat straw. *The Journal of Animal & Plant Sciences*. 23, 1166-1176.
- Bishop, K.S., Kao, C.H., Xu Y., Glucina, M.P., Paterson, R.R., Ferguson, L.R., 2015. From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry*. 114, 56-65.
- Bolaños, A.C., Bononi, V.R.L., Suárez-Villota, E.Y; Gugliotta, A.; Muñoz, J.E. 2016. Diversity of *Ganoderma* species occurring in leguminous plants and dead trees in two regions of the Neotropics, a phylogenetic and morphological approach.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., 1988. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading Basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochemical Journal*. 255, 445-450.
- Cao, Y., Wu, S.H., Dai, Y.C., 2012. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom “*Lingzhi*”. *Fungal Diversity*. 56, 49–62.
- Carvalho, W., Ferraz, A., Milagres, A.M.F., 2008. Clean-up and concentration of manganese peroxidases recovered during the biodegradation of *Eucalyptus grandis* by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme Microb. Technol.* 43,193-198.
- Chen, C., Chang, H., Kirk, T.K. 1982. Aromatic-acids produced during degradation of lignin in spruce wood by *Phanerochaete chrysosporium*. *Holzforschung*, 36, 3–9.
- Data, A., Bettermann, A., Kirk, T., 1991. Identification of a Specific Manganese Peroxidase among Ligninolytic Enzymes Secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during Wood Decay. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 1453-1460.

- Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P., Bally, R., 2000. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the *rhizospheric bacterium Azospirillum lipoferum*. *Soil Biol. Biobiochem.* 32, 919–927.
- D'Souza, T.M., Merritt, C.S., Reddy, C.A., 1999. Lignin-Modifying Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5307-5313.
- Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.E., 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1151-1158.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*. 144, 37–42.
- Elissetche, J.P., Ferraz, A., Freer, J., Rodríguez, J., 2007. Enzymes produced by *Ganoderma australe* growing on wood and in submerged cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 429-434.
- Eriksson, K.E.L., Bermek, H., 2009. Lignin, lignocellulose, ligninase. In: Schaechter M (ed) *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd ed, Elsevier, Oxford. pp. 373–384. United Kingdom.
- Hatakka, A., 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol.* 13, 125–135.
- Hariharan, S., Nambisan, P., 2013. Optimization of lignin peroxidase, Manganese peroxidase and lac production from *Ganoderma lucidum* under solid state fermentation of pineapple leaf. *BioResources*. 8, 250-271.
- Huang, M.S., Cheng, Y.Q., 2000. Decolorization and degradation of white rot fungi for dye. *Shanghai Environ Sci.* 19, 124-128.
- Hullo, M.F., Moszer, I., Danchin, I., Martin-Verstraete, I., 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *Journal of Bacteriology* 183: 5426-5430.

- Hushiarian, R.N., Yusof, N.A., Dutse, S.W., 2013. Detection and control of *Ganoderma boninense*: strategies and perspectives. Springer Plus, 2, 555.
- Janusza, G., Kucharzyk, H.K., Pawlika, A., Staszczaka, M. Paszczynskic, A.J., 2013. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. Enzyme and Microbial Technology 52, 1-12.
- Kirk, T.K., 1981. Toward Elucidating the Mechanism of Action of the Ligninolytic Systems in Basidiomycetes. In Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals (Hollaender, A., Rabson, R., Rogers, P., Pietro, A., Valentine, R. and Wolfe, R., eds), pp. 131-149.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Letters. 169, 247-250.
- Levin, L., Melignani, E., Ramos, A.M., 2010. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye Decolorization by selected culture filtrates. Bio resource Technology. 101, 4554–63.
- Lobos, S., Larrain, J., Salas, L., Cullen, D., Vicuña, R., 1994. Isoenzymes of manganese dependent peroxidase and laccase produced by the lignin degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. Microbiology. 140, 2691–2698.
- Manavalan, T., Manavalam, A., Thangavelu, K., Heese, K., 2012. Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse. Journal of proteomics. 77, 298-309.
- Mayer, A.M. 1987., Polyphenol oxidases in plants – recent progress. Phytochemistry. 26, 11–20.
- Mayer A.M., Staples R.C., 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry. 60, 551–565.

- Mehboob, N., Asad, M.J., Imran, M., Gulfraz, M., Wattoo, F.H., Hadri, S.H., Asghar, M., 2011. Production of lignin peroxidase by *Ganoderma lucidum* using solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology*. 10, 9880-9887.
- Naher, L., Yusuf, U.K., Ismail, A., Tan, S.G., Mondal, M-M.A., 2013. Ecological status of *Ganoderma* and basal stem rot disease of oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Australian journal of crop science*. 7, 1723-1727.
- Pokhrel, D., Viraraghavan, T., 2005. Municipal solid waste management in Nepal: practice and challenges. *Waste Manag*. 25, 555-562
- Rajendran, L., Raguchander, T., Samiyappan, R., 2008. Cloning and characterization of a laccase gene from *Ganoderma* spp. causing basal stem rot disease in coconut. *Phytopathol. Mediterr*. 47, 98–106.
- Riley, R., Salamov, A.A., Brown, D.W., Nagy, L.G., Floudas, D., Held, B.W., Levasseur, A., Lombard, V., Morin, E., Otiillar, R., Lindquist, E.A., Sun, H., LaButti, K.M., Schmutz, J., Jabbour, D., Luo, H., Baker, S.E., Pisabarro, A.G., Walton, J.D., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martin, F., Cullen, D., Hibbett, D.S. & Grigoriev, I.V. 2014. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:9923-9928.
- Ríos, S., Eysaguirre, J., 1992. Conditions for selective degradation of lignina by the fungus *Ganoderma australis*. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 37, 667-669.
- Sankaran, K.V., Bridge, P.D., Gokulapalan, C., 2005. *Ganoderma* diseases of perennial crops in India – an overview. *Mycopathologia*. 159, 143–152.
- Sánchez-Amat, A., Lucas-Elio, P., Fernández, E., Garcia-Borron J.C., Solano F., 2001. Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim. Biophys. Acta* 1547,104-116.

- Silva, C.M., Soares de Melo, I., Roberto de Oliveira, P., 2005. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology*. 37, 324-329.
- Simonić, J., Vukojević, J., Stajić, M., Glamočlija, J., 2010. Intraspecific Diversity within *Ganoderma lucidum* in the Production of Laccase and Mn-Oxidizing Peroxidases During Plant Residues Fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*. 162, 408–415.
- Songulashvili, G., Elisashvili V., Wasser, S., Nevo, E., Hadar, Y., 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*. 41, 57–61.
- Tamara, V., Kalsi, M., Hatakka, A., 1995. Lignin Peroxidases, Manganese Peroxidases, and Other Ligninolytic Enzymes Produced by *Phlebia radiata* during Solid-State Fermentation of Wheat Straw. *Applied and environmental microbiology*. 61, 3515–3520.
- Tien, M., Kirk, T.K., 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science*. 81, 2280-2284.
- Wang, H., 2009. Application of ligninolytic enzymes generated by white rot fungi in environment improvement. *Mod Bus Trade Ind*. 21, 297-298.
- Wang, P., Hu, X., Cook, S., Begonia, M., Lee, K.S., Hwang, H.-M., 2008. Effect of culture conditions on the production of ligninolytic enzymes by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 20696) and separation of its lignin peroxidase. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 24, 2205–2212.
- Wong, D.W.S., 2009. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*. 157, 174–209.
- Valmaseda, M., Martínez, M.J., Martínez, A.T., 1991. Kinetics of wheat straw solid-state fermentation with *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus*— lignin and polysaccharide

alteration and production of related enzymatic activities. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35, 817– 823.

Vares, T., Kalsi, M., Hatakka, A., 1995 Lignin Peroxidases, Manganese Peroxidases, and Other Ligninolytic Enzymes Produced by *Phlebia radiata* during Solid-State Fermentation of Wheat Straw. Applied and Environmental Microbiology. 35, 15–3520.

Zhou, X.W., Cong, W.R., Su Q.K., Zhang, Y.M., 2012. Ligninolytic enzymes from *Ganoderma* spp: current status and potential applications. Critical Reviews in Microbiology. 1, 111.

Zhou, L.W., Cao, Y., Wu, S.H., Vlasák, J., Li, D.W., Li, M.J., Dai, Y.C., 2015. Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (Ganodermataceae, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. Phytochemistry. 114, 7-15.

CAPÍTULO 4. Detecting Manganese Peroxidase (MnP) gene in *Ganoderma* species

Ana Cristina BOLAÑOS^{1,2}, Vera Lúcia Ramos BONONI², Jorge Mario LONDOÑO³, Vera María VITALI², Adriana de Mello GUGLIOTTA² & Jaime Eduardo MUÑOZ³.

1. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, calle 13 No. 100-00, Cali – Colombia.
2. Instituto de Botânica, Núcleo de pesquisa em Micologia. Av. Miguel Stéfano 3687, São Paulo, Brasil.
3. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Colombia, Carrera 32 No 12 - 00 Chapinero, Vía Candelaria Palmira - Valle del Cauca - Colombia

Corresponding author. Tel. + 57 2 3393243

E-mail address: ana.bolanos@correounivalle.edu.co

RESUME

Les manganèse-peroxydases font partie d'un groupe d'enzymes extracellulaires, responsables de la dégradation de la lignine et sont produites par des Basidiomycetes, connues comme des champignons de la pourriture blanche du bois. Dans les *Ganoderma* spp., la présence de ce type d'enzymes a été vérifiée dans des cultures liquides, mais souvent, elle n'est pas toujours détectée dans des fermentations solides. Dans ce travail on a évalué la présence des gènes de manganèse-peroxydases (MnP) dans des isollements de *G. australe*, *G. gibbosum*, *G. multiplicatum*, dans le complexe de *G. parvulum* et *G. subamboinense* employant l'amplification partielle des gènes qui les codifient. Les résultats obtenus, ont confirmé la présence du gène MnP en 12 isollements des différentes espèces de *Ganoderma*. Les séquences obtenues ont présenté une haute similarité et elles ont permis de distinguer les mêmes cinq espèces délimitées à travers des analyses de la région ITS. 12 nouvelles séquences provenant de 5 espèces de *Ganoderma* ont été générées et furent déposées dans la data base Genbank.

Mot Clés: Ganodermataceae, Néotropical, Dégradation de la lignine, Phylogénie, champignons de la pourriture blanche

ABSTRACT:

Manganese peroxidase (MnP) belongs to the group of extracellular enzymes produced to degrade lignin by Basidiomycetes species called white-rot fungi. In *Ganoderma* spp., the presence of this enzyme has been found in liquid culture, but has not always been detected in solid fermentation. In this study the presence of MnP gen of *G. australe*, *G. gibbosum*, *G. multiplicatum*, *G. parvulum* complex and *G. subamboinense* was assessed by means of conducting partial sequencing for (MnP) gen. The results obtained confirmed the presence of the gen in 12 isolates of the different *Ganoderma* species evaluated. The sequences obtained are highly similar and enable discriminating the same five species of *Ganoderma* delimited through ITS analysis. Twelve new sequences representing five *Ganoderma* species were generated in this study and deposited in Genbank.

Key word: Ganodermataceae, Lignin degradation, Phylogeny, White root fungi.

INTRODUCTION

Lignin is one of the largest biopolymers produced in the earth's ecosystems and a main constituent of the cellular wall of plants responsible for their rigidity and protection (Raven 2008). Lignin, cellulose and hemicellulose's natural degradation to carbon is done by the action of fungi called white-rot fungi of the Basidiomycota phylum. Those fungus species grow on lignocellulose substrates and produce lignin peroxidase enzymes, manganese peroxidase, and laccase to carry out the degradation. Not always the three enzymes are produced by all species of white-rot fungus (Hatakka 1994; Arora & Sharma 2010).

Ganoderma Karst. species (Polypores, Agaricomycetes) are white-rot fungi, serious pathogens in some cultivations, broadly used for medicinal purposes, but also valued for their capacity of producing lignin-degrading extracellular enzymes. In *Ganoderma* species lignin-modifying enzymes (LME) are lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase (Zhou *et al.* 2012). Production of LME enzymes varies significantly in the *Ganoderma* genus and the type of enzyme produced depends on the species and type of culture used: liquid culture or solid fermented culture (Silva *et al.* 2005; Elissetche *et al.* 2007). Laccase is perhaps the enzyme more usually detected in different species of the genus and under different conditions of substrate. Low activity of manganese peroxidase was detected in substrates of solid fermentation and LiP was only been detected when physical and nutritional conditions are enhanced in solid fermentation processes of substrates based on wheat straw and corn residues (D'Souza *et al.* 1999; Mehboob *et al.* 2011; Batool *et al.* 2013).

Manganese peroxidase [EC 1.11.1.13, Mn (II): hydrogen-peroxide oxidoreductase, MnP], was isolated and characterized in *Phanerochaete chrysosporium* (Kuwahara *et al.* 1984; Paszczynski *et al.* 1985). The genome of this species contains 5 MnP (MnP 1-5) gens which codify several isoforms. MnP is composed on average of 370 amino acids (Alic *et al.* 1997). MnP is an acid glycoprotein with one isoelectric point of 4.5, 45 kDa molecular weight on average and presents a series of isoenzymes. In addition to the MnP isoenzymes detected in *Phanerochaete chrysosporium*, in *Ceriporiopsis subvermispora* 11 isoforms for MnP have also been described (Lobos *et al.* 1994), which are codified by a cluster of gens tightly related.

Manganese peroxidase oxidizes phenolic compounds and is an enzyme of great interest due to its application in wood pulp production, biobleaching and bioremediation (Janusz *et al.* 2003). Study of the genome of *Ganoderma* species and other Polypores have uncovered the existence of a high number of gen peroxidases from different subfamilies of the Manganese peroxidase gen. Analysis of the states of evolutionary reconstruction shows that this MnP gen is the precursor of all class-II ligninolytic peroxidases (Ruiz-Dueñas *et al.* 2013). The goal of this research was to determine the presence of the peroxidase manganese gene in thirteen strains of *Ganoderma* which have not shown activity for this enzyme in previous chemical tests included in the standard methodology (Kuwahara *et al.*, 1984, Lundell *et al.*, 1990).

MATERIAL AND METHODS

Fungal specimens and culture

Basidiomata of *Ganoderma australe*, *G. gibbosum*, *G. multiplicatum* complex *G. parvulum*, *G. subamboinense* and *Ganoderma* sp., were collected on leguminous trees alive and fallen logs in urban and protected areas in Brazil and Colombia. Table 1 shows the specimens collected. The specimens were prepared for taxonomic study and isolated in malt extract (MEA) at 2%. Twenty five mycelium disks of 5mm of each strain were retrieved from the culture with a leaf perforator and inoculated in 250ml Erlenmeyer flasks containing 100ml of malt extract and incubated at 30 °C. One week later they were filtered in a vacuum pump, washed with sterile water, dried with paper towel and stored in filter paper at -20°C.

DNA isolation, PCR amplification

fifty mg of the mycelium obtained in liquid culture of malt extract 2% were ground in liquid nitrogen. From this ground material DNA genome was extracted (Raeder & Broda, 1985). The amplification of the specific region of the codifying gen for the manganese peroxidase enzyme (MnP) was paired with primers E2FB (GAC CTS CAG AAG AAC CTG TTC SA) and E8R (CGG AGY TGS GTC TCG ATG AAG (Isikhuemhen *et al* 2002). To obtain amplification the conditions of the PCR reactions suggested by Vigalys & Hester (1990) were followed. Visualization of the amplified products was done in agarose gel at 1.5%, dyed with GelRed® Biotium. Molecular sizes were estimated with a lambda marker 100bp plus Invitrogen®.

Cloning

The product of PCR of genomic DNA of each species of *Ganoderma* tested was cloned in *E. coli* DH5α through vector PGEM-T-easy Promega® accordingly to the indications proposed by the manufacturer. For this purpose cells of *E. coli* were prepared. The products of PCR of genomic DNA linked to vector PGEM – T-easy. Colonies were selected by using selective means with IPTG and Xgal as indicators (Inoue *et al* 1990). The pellet obtained was purified with Kitt de Promega®, accordingly to the manufacturer's suggestions. To check incorporation of the graft into the bacterium, a PCR reaction with universal primers SP6 and T7 was done at 95°C for 2min, followed with 36 cycles at 94°C for 30sec, 50°C for 1min, 72°C for 1 min, with a final extension of 72°C for 5min. To check the degree of polymorphism present in the amplified PCR products, a restriction with enzyme Hinf I originated from *Haemophilus influenza* Rf, whose site of recognition is 5'... G[↓]ANTC...3' 3'... CTNA[↑]G...5', was done (Vilgalys & Hester 1990).

Sequencing

To correlate the products treated with HinfI enzyme and the degree of polymorphism identified, sequencing and purification of the cloned products were done based on the regions cleared by primers T7 and SP6 by MacroGen.

Phylogenetic analysis

The partial sequences of this gene were assembled and edited with the software Chromas PRO software version 2.1. The aligned process was carried out manually by the use of Bioedit Sequence Alignment Editor software (Hall 1999). The reconstruction of phylogenetic background was inferred by the maximum likelihood method using the software PAUP version 4.0b10 (Swofford, 2002), a heuristic search with a hundred replicates, TBR algorithm (Tree-Bisection-Reconnection) was used to adjust the topology (Branch-swapping), the model of nucleotide substitution was selected by the criterion of Akaike in ModelTest version 2.1.3 (Darriba et al 2012.); statistical support to the nodes of phylogenetic trees was assessed using the bootstrap maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and Bayesian inference analysis; MP bootstrap was performed with 10,000 re-sampling in the case of ML was 100; the analysis of Bayesian inference was performed with MrBayes software version 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001, Ronquist & Huelsenbeck 2003), using the Markov-chain Monte Carlo algorithm, with 10 million generations, with the trees sampled every 100th generation. A consensus tree was constructed using the latest 50,000 trees (50% of the most representative trees).

RESULTS AND DISCUSSION

The 13 isolations used in this molecular analysis were previously assessed in solid fermentation of a substrate based on sibipiruna wood (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.) wetted with water and with mal extract to check the activity of MnP enzyme. Out of the 10 strains grown, enzymatic activity for MnP was only detected in the complex *Ganoderma parvulum* (data not presented).

Through the PCR conducted in this molecular analysis all the isolations amplified and showed fragments of approximately 700 pb. These results show that all the isolations tested present the gen of the MnP enzyme and probably events linked to the gen's expression prevent its being detected in solid fermentation culture. In white-rot fungi, the gen's expression that codifies for MnP enzyme is highly influenced by environmental factors, such as concentration of nitrogen, carbon, metals and temperature, and several isoenzymes are differently regulated by carbon (Pease & Tiem 1992).

Agarose gel at 2% dyed with GelRed® and the marker of molecular size lambda 100 pb plus showed the presence of one or two bands with an approximate difference of 100 bp between them. In spite of the use of different thermal profiles incrementing the temperature of alignment and checking to evidence whether those two bands corresponded to some non-specificity of the primer or to a polymorphic event of the same allele, those bands were

always present. Said bands occurred in the three isolations of the species, *G. australe* (K, M, N), in a specimen of *G. gibbosum* (D), from Brazil, and in the three isolations of the complex *G. parvulum* (E, F, H,) from Colombia. *G. multiplicatum* (C and I) and *G. subamboinense* (A) presented only one band (Figure 1)

The comparison of the restriction profile generated by the individuals assessed after the digestion of the products amplified with *Hinfl* enzyme, originated from *Haemophilus influenza* Rf, whose site of recognition is G ANTC.....3' 3'.... CTNA G....5', was

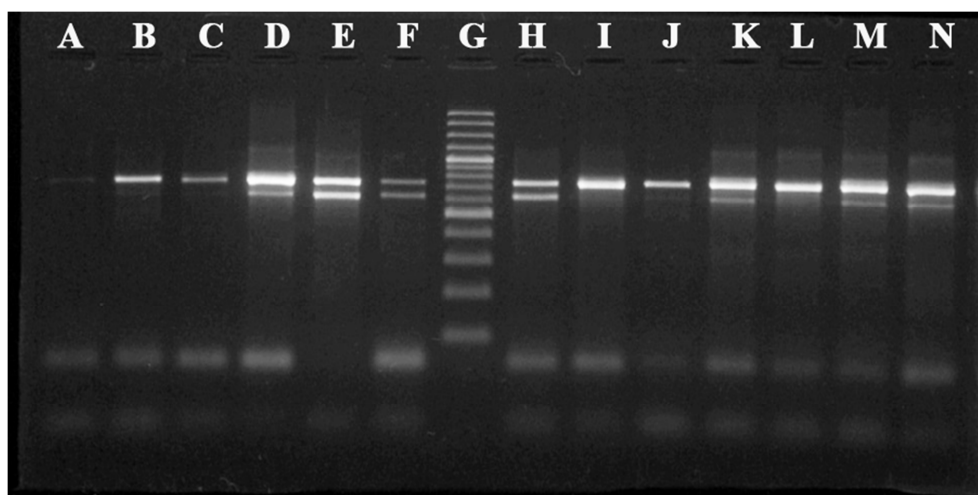


Fig. 1. Product of PCR. A) *Ganoderma subamboinense*. B, D, J, L) *Ganoderma gibbosum*. C and I) *Ganoderma multiplicatum*. E, F, H) *Ganoderma parvulum* complex. K, M and N) *Ganoderma australe*. G) Molecular weight.

reported by Vilgalys & Hester (1990) as a good indicator of amplified fragments. In this profile it was observed that the pattern of bands and weight are characteristic for species *G. australe*, *G. gibbosum* and *G. subamboinense*. Two strains of *G. parvulum* presented the same pattern.

In the presence of two bands and assuming that those were two allelic variants of the gen, the fragments obtained were cloned and sequenced (Figure 2). The amplification of the isolations after cloned showed only one band of approximately 700 bp except for isolation J, where the colony analyzed did not incorporate the graft.

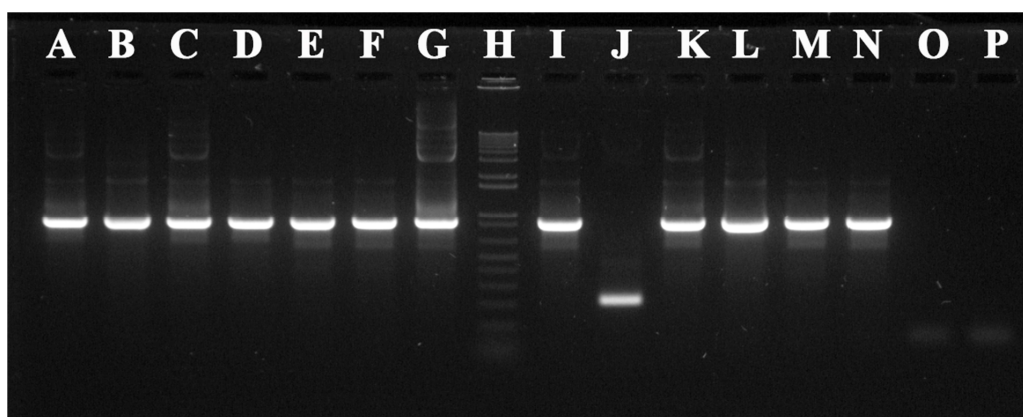


Fig 2 . PCR of fragments after cloning. A). *G. subamboinense*. B, D). *G. gibbosum*. C, I). *G. multiplicatum*. E, F, G). *Ganoderma parvulum* Complex. K, L, M, N). *G. australe*. O, P). Controls. H.) Molecular weight. J. Colony non-amplified.

The analysis of restriction of these cloned fragments showed that the gen has several alleles in the different isolations tested, which indicates that the expression of those multiple enzymatic variants have different degrees of enzymatic activity (Figure 3). According to Bollag & Leonowicz (1984), isoenzymes have different kinetics, chemical-physical features and functions during the cycle of development of a fungus. Maybe the characteristic features of each isoenzyme explain both the different patterns of expression and ligninolytic enzymatic activity (Manzur *et al.* 1998).

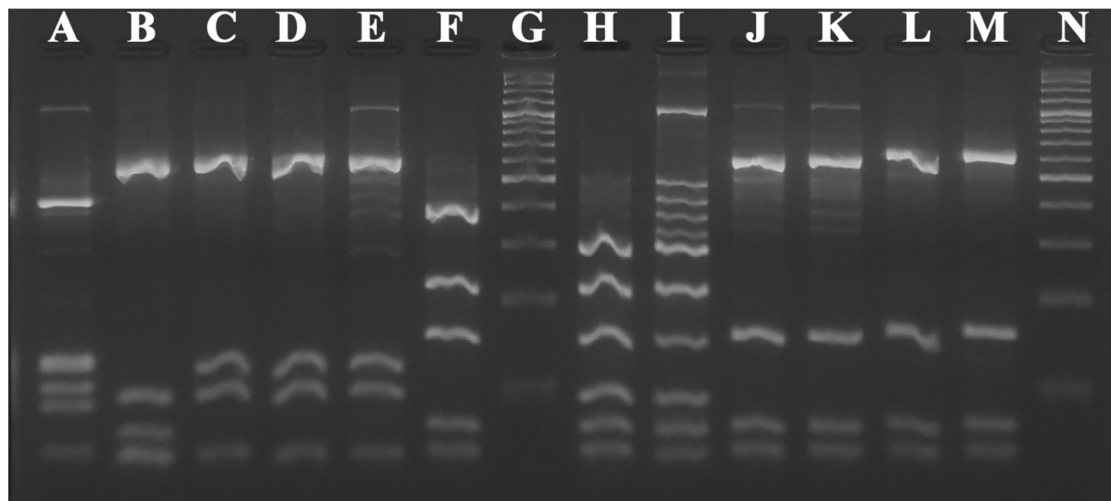


Figure 3. Analysis of restriction of cloned products of the MnP gen in *Ganoderma*. A) *G. subamboinense*. B, C and D) *G. gibbosum*. E and F) *G. multiplicatum*. G and N) Molecular weight. H, I and J) *G. parvulum* complex. K, L and M) *G. australe*.

Exploratory analysis of the phylogenetic background of the 12 isolations of *Ganoderma* was done to observe the relation among the sequences obtained. To compare the sequences of the MnP gen for *Ganoderma* obtained in this study, *Trametes versicolor* was used as an external group. Sequences of gen for species of *Ganoderma* were not found in GenBank. The relation

among these sequences recovered from the gen of the MnP was assessed through the maximum likelihood method; the model of nucleotide substitution conducted with J-model Test version 2.1.3 (Darriba *et al* 2012) was determined as HKY+G with 0.416 as alpha parameter of the gamma distribution. The nucleotide frequencies were T= 0.2220, C= 0.3515, A= 0.1800 and G= 0.2465. Figure 4 represents the reconstruction of the phylogenetic background of the sequences found.

The matrix of the data of 12 sequences of the MnP gen of the complex *Ganoderma parvulum* and one of the external groups was 821 pb. In the sequences analyzed, 498 characters or 60.7% were identical, 167 characters or 20.3% were parsimoniously informative, 156 variable characters or 19% were parsimoniously non-informative. The most parsimonious trees had longitude 186, a consistence index of 0.8142 and a retention index of 0.8157. All strains analyzed presented the MnP gen and through said gen isolations of the species *G. australe*, *G. gibbosum*, *G. multiplicatum*, complex *G. parvulum* and *G. subamboinense* grouped.

The exploratory analysis conducted with the MnP gen detected in the 12 isolates assessed and compared to the ITS gen (Figure 5), historically used to solve taxonomic problems, showed that the MnP gen is an efficient marker to delimitate *Ganoderma* species.

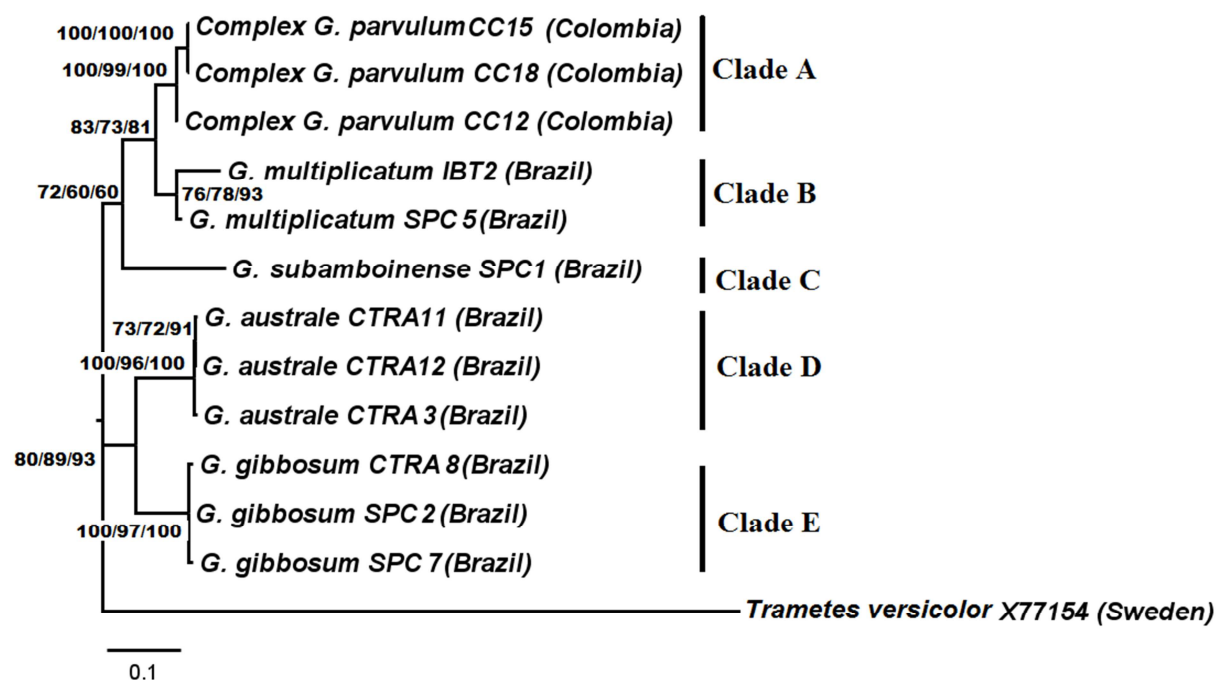


Figure 4. Tree generated by the MnP gen for different *Ganoderma* strains.

The clades generated for the different species were characterized for having bootstraps with high supports, in addition to their showing the same groupings than those observed in the inference analysis conducted for the ITS region.

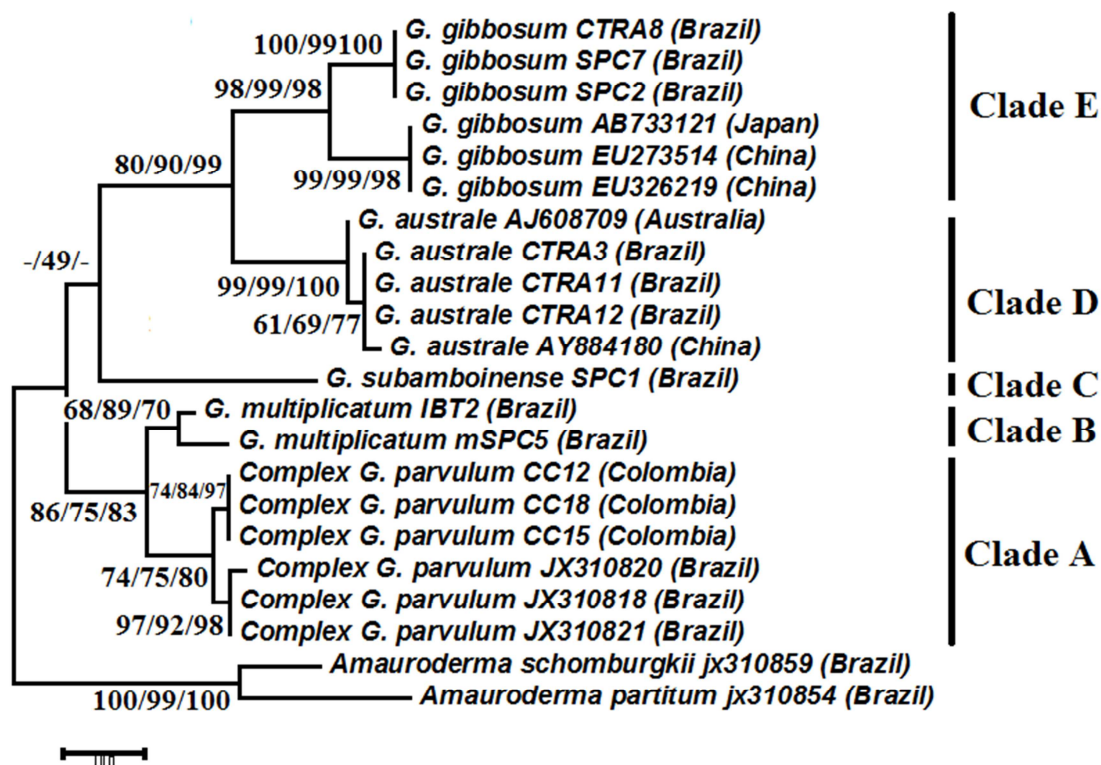


Figure 5. Tree generated by the ITS gen for the different *Ganoderma* strains.

Acknowledgements

Authors thank FAPESP and Universidad del Valle for their financial support. We thank Paul Chavarriaga, Maria Eugenia Recio and Alba Lucia Chavez of the International Center for Tropical Agriculture-CIAT for clearing the laboratory for us to conduct part of the work. We thank Alex Mora for enabling us to use bioinformatics analyses software.

REFERENCES

- ALIC M., AKILESWARAN L. & GOLD, M.H., 1997- Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isozyme 3 from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochimica et Biophysica Acta* 133(8):1–7.
- ARORA D.S. & SHARMA R.K. 2010- Ligninolytic Fungal Laccases and Their biotechnological Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160(6):1760–1788.
- BATOOL S., ASGHER M., SHEIKH M.A. & RAHMAN, S.U., 2013— Optimization of physical and nutritional factors for enhanced production of lignin peroxidase by *Ganoderma lucidum* ibl-05 in solid state culture of wheat straw. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 23:1166-1176.
- BOLLAG J.M. & LEONOWICZ, A., 1984- Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environment Microbiology* 48(4):849–54.

- DARRIBA, D., TABOADA, G.L., DOALLO, R. & POSADA, D., 2012- 'JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing', *Nature Methods* 9:772.
- D'SOUZA T.M., MERRITT C.S. & REDDY C.A., 1999- Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied Environmental Microbiology* 65(12):5307–5313.
- ELISSETCHE J.P., FERRAZ A., FREER A. & RODRÍGUEZ J., 2007- Enzymes produced by *Ganoderma australe* growing on wood and in submerged cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 3(23): 429-434.
- HALL T.A., 1999- BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41:95-88.
- HATAKKA A., 1994-Lignin-modifying enzymes from selected white rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 2-3(13): 125–135.
- HUELSENBECK J.P. & RONQUIST F., 2001- 'MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic', *Bioinformatics* 17:754-755.
- INOUE H., NOJIMA H. & OKAYAMA H., 1990- High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1):23-28.
- ISIKHUEMHEN O., JAMES T., LIOU S., STOYCHEV I., EICHLEROVÁ I., NERUD F. & VILGALYS, R., 2002- Genetic and physiological characterization of two ligninolytic enzymes in two geographically isolated strains of *Pleurotus Djamor*. Monography Chapter: Proceedings of the Fourth International Conference. Mexico. 133-140. Permanent Link: <http://hdl.handle.net/11104/0051952>.
- JANUSZ G., KUCHARZYK K.H., PAWLIKA A., STASZCZAKA M. & PASZCZYNSKIC, A.J., 2013- Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial Technology* 52 (1):1– 12.
- KUWAHARA M., GLENN J.K., MORGAN M.A. & GOLD M.H., 1984- Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS letters* 2(169):247–250.
- LOBOS S., LARRAM J., SALAS L., CULLEN D. & VICUÑA R., 1994- Isoenzymes of manganese dependent peroxidase and laccase produced by the lignin degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Microbiology* 14:2691–2698.
- MANSUR M., SUAREZ T. & GONZALEZ A.E., 1998— Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied and Environment Microbiology* 64(2):771–4.
- MEHBOOB N., ASAD M.J., IMRAN M., GULFRAZ M., WATTOO F.H., HADRI S.H. & ASGHAR, M., 2011- Production of lignin peroxidase by *Ganoderma lucidum* using solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology* 10:9880-9887.

- PASZCZYNSKI A., HUYNH V.B. & CRAWFORD R., 1985-Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives Biochemistry Biophysics* 242 (29):329–341.
- PEASE E.A. & TIEN, M., 1992- Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* 174:3532–3540.
- RAEDER U., & BRODA P., 1985- Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1(1): 17-20.
- RAVEN P. H., EVERT R. F. & EICHHORN, S. E., 2005- Biology of plants. W. H. Freeman.686 pp.
- RONQUIST F. & HUELSENBECK J.P., 2003- ‘MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models’’ *Bioinformatics*, 12(19):1572-1574.
- RUIZ-DUEÑAS F. J., LUNDELL T., FLOUDAS D., NAGY L.G., BARRASA J.M., HIBBETT D.S. & MARTINEZ, A.T., 2013- Lignin-degrading peroxidases in Polyporales: an evolutionary survey based on 10 sequenced genomes. *Mycologia* 105(6): 1428–1444.
- SILVA C., MELO I. & OLIVEIRA P., 2005- Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme and microbial Technology* 37:324– 329.
- SWOFFORD D.L. 2002- PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- VILGALYS R. & HESTER M., 1990- Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from several *Cryptococcus Species*. *Journal of Bacteriology*, 172(8) 4238 - 4246.
- ZHOU X.W., CONG W.R., SU Q.K. & ZHANG Y.M., 2013- Ligninolytic enzymes from *Ganoderma* spp: current status and potential applications. *Critical Reviews in Microbiology*: 39(4): 416-426.

Table 1. *Ganoderma* specimens collected in leguminous trees and dead stump.

Species	Origin	Collection Number	Host
<i>G. australe</i>	Brazil	SP417784(CTRA-3) SP417796 (CTRA-11) SP417793 (CTRA-12)	Dead stump Dead stump Dead stump
<i>G. gibbosum</i>	Brazil	SP417774(SPC-2) SP417798(SPC-7) SP417781(IBT-3) SP417788(CTRA-8)	<i>Inga vera</i> Willd <i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth. Dead stump Dead stump
<i>G. multiplicatum</i>	Brazil	SP417797(SPC-5) SP417780(IBT-2)	<i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth. Dead stump
<i>Ganoderma parvulum</i> complex	Colombia	CUVC60084 (CC-15) CUVC60081 (CC-12) CUVC60087(CC-18)	<i>Cassia fistula</i> L. <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit <i>Phitecelobium dulce</i> (Roxb.) Benth.
<i>G. subamboinense</i>	Brazil	SP417773(SPC-1)	<i>Caesalpinia ferrea</i> C. Mart.

Figure 1. Product of PCR. A) *Ganoderma subamboinense*. B, D, J, L) *Ganoderma gibbosum*. C and I) *Ganoderma multiplicatum* E, F, H) Complex *Ganoderma parvulum*. K, M and N) *Ganoderma australe*. G) Weight marker.

Figure 2 . PCR of fragments after cloning. A). *G. subamboinense*. B, D). *G. gibbosum*. C, I). *G. multiplicatum*. E, F, G). Complex *Ganoderma parvulum*. K, L, M, N). *G. australe*. O, P). Controls. H.) Marker. I. Colony non-amplified.

Figure 3. Analysis of restriction of cloned products of the manganese peroxidase gen in *Ganoderma*. A) *G. subamboinense*. B, C and D) *G. gibbosum*. E and F) *G. multiplicatum*. G and N)Weight marker (H, I and J) Complex *G. parvulum*. K,L and M) *G. australe*.

Figure 4. Tree generated by the manganese peroxidase gen for the different *Ganoderma* strains.

Figure 5. Tree generated by the ITS gen for the different *Ganoderma* strains.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises morfológica e molecular deste estudo permitiram determinar que no Brasil há, pelo menos, duas espécies representando o subgênero *Elfvigia* não lacadas, sendo que uma delas corresponde a *G. australe*. De acordo com a análise realizada, tentativamente, a outra espécie poderia ser chamada *G. gibbosum*. Ressalta-se que outros estudos serão necessários para confirmar a delimitação desta espécie.

As espécies *G. subamboinense*, *G. multiplicatum* e *G. gibbosum* ocorrem como parasitas de leguminosas utilizadas em arborização urbana na cidade de São Paulo, Brasil. Em Cali – Colômbia, em leguminosas encontram-se *G. multiplicatum* e uma espécie do complexo *G. parvulum*.

Através dos dados morfológicos suportados pela análise molecular concatenada das sequências ITS, LSU, SSU e MnP obtidas, mais um táxon foi incluído na lista de espécies do gênero *Ganoderma* para a Colômbia, ampliando desta maneira a área de distribuição geográfica de *G. multiplicatum* no neotrópico.

As sequências ITS, LSU, SSU obtidas neste estudo contribuem para enriquecer a base de dados do GenBank para as espécies neotropicais de *Ganoderma*. Isto é importante pois uma das principais dificuldades para identificar as espécies do gênero é a falta de material para comparação. Nem todas as espécies descritas têm registro de sequências e é preciso começar a construir uma classificação mais confiável para os trópicos.

As sequências obtidas para o gene da enzima manganês peroxidase (MnP), colocadas no Genbank, permitirão determinar linhagens com potencial de uso biotecnológico.

Os resultados aqui obtidos mostram que na Colômbia o conhecimento do gênero *Ganoderma* é incipiente e mais pesquisas são necessárias para delimitar as espécies que nesta análise filogenética formaram os clados D e E antes de se propor novos táxons.

Com base na separação filogenética das espécies *G. multiplicatum* e *G. subamboinense* obtida com coleções do Brasil pode-se invalidar a sinonímia entre essas duas espécies.

Por outro lado, é preciso aceitar que *G. parvulum* é um complexo e *G. chalceum* precisam de mais estudos. *G. chalceum* deve ser referenciado como *G. cupreum*, o nome válido.

O presente trabalho evidenciou que mais estudos de ecologia e fisiologia do desenvolvimento precisam ser feitos para ajudar na delimitação de espécies do gênero *Ganoderma*.

Através das análises enzimáticas realizadas em substratos baseados em serragem umedecida com água e serragem com extrato de malte foi verificado que a lacase é uma das principais enzimas presentes. Quando estas linhagens são comparadas de acordo ao tipo nutricional natural, as linhagens parasitas responderam melhor a meios mais enriquecidos com carbono. De modo geral a atividade enzimática é maior e mais diversificada nas linhagens parasitas do que nas sapróbias.

A falta ou pequena atividade enzimática observada para peroxidases como manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP) não significa sua ausência, já que MnP foi observada em meio de cultura líquido e fatores como a presença de compostos químicos flavonóides e terpenóides, responsáveis pela cor escura da madeira de sibipiruna, podem dificultar a leitura das enzimas produzidas. Outros fatores a serem considerados são os fenômenos ligados a eventos de expressão genética de acordo com as condições presentes no meio.

6. LITERATURA CITADA

- Adaskaveg, J.E. & Gilbertson, R.L.** 1987. Vegetative Incompatibility between Intraspecific Dikaryotic Pairings of *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Mycologia* 79: 603-613.
- Adaskaveg, J.E. & Gilbertson, R.L.** 1988. Basidiospores, pilocystidia, and other basidiocarp characters in several species of the *Ganoderma lucidum* complex. *Mycologia* 80: 493-507.
- Adaskaveg, J. E. & Gilbertson, R. L.** 1989. Cultural studies of four North American species in the *Ganoderma lucidum* complex with comparisons to *G. lucidum* and *G. tsugae*. *Mycological Research* 92:182-191.
- Aguiar, A., Souza-Cruz & Ferraz, A.P.** 2006. Oxalic acid, Fe^{3+} -reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 873-878.
- Alcaldia Municipal de Palmira.** 2012. Plan Municipal de Gestión del Riesgo de Desastres. Palmira, 40p.
- Arantes, V., Baldocchi, C. & Milagres, A.M.F.** 2006. Degradation and decolorization of a biodegradable-resistant polymeric dye by chelator-mediated Fenton reactions. *Chemosphere* 63:1764-1772.
- Ariffin, D., Idris, A.S. & Singh, G.** 2000. Status of *Ganoderma* in oil palm. In: J. Flood, P.D. Bridge & M. Holderness (eds). *Ganoderma diseases in perennial crops*. Cabi publishing, New York, pp. 49-68.
- Atkinson, G.F.** 1908. Observation on *Polyporus lucidus* Leyss. Ad some of its allies from Europe and North America. *Bot. Gazette* 46:321-338.

- Bach, J.P., Deuster, O., Balzer-Geldsetzer, M., Meyer, B., Dodel, R. & Bacher, M.** 2009. The role of macrophage inhibitory factor in tumorigenesis and central nervous system tumors. *Cancer* 115: 2031-2040.
- Baltazar, J.M. & Gilbertoni, T.** 2009. A checklist of Aphyllophoroid fungi (Basidiomycota) recorded from the Brazilian Atlantic Rain Forest. *Mycotaxon* 109: 439-442.
- Batlett, J.M.S & Stirling, D.** 2003. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology* 226:3-6
- Bazzalo, M. E. & Wright, J. E.** 1982. Survey of the Argentine species of the *Ganoderma lucidum* complex. *Mycotaxon* 16: 295-325.
- Bazinet, A., Zwickl, D.J. & Cummings, M.P.** 2014. A Gateway for Phylogenetic Analysis Powered by Grid Computing Featuring GARLI 2.0. *Systematic Biology*. 0:1-7.
- Beerbee, M.I., & Taylor, J.W.** 2001. Fungal molecular evolution: Gene trees and geologic time. *In*: L. McLaughlin (ed.). *The Mycota VII part B*. Berlin, pp, 229-243.
- Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M. & Maier, W.** 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:99-108.
- Binder, M., Hibett, D.S., Larsson, K.H., Larsson, E., Langer, E. & Langer, G.** 2005. The phylogenetic distribution of resupinate forms across the major clades of mushroom- forming fungi (homobasidiomycetes). *Syst. Biodivers.* 3:113-157.
- Binder, M., Justo, A., Rylei, R., Salamov, A., López-Giraldes, F., Sjökvist, E., Copeland, A., Foster, B., Larsson, E., Sun, H., Larsson, K.H., Townsend, J., Grigoriev, I.V. & Hibbett, D. S.** 2013. Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. *Mycologia* 105:1350-1373.

- Bolaños, A.C., Monsalve, M., González, R.T.** 2011. Ocurrencia del Género *Ganoderma* en la vegetación urbana de Municipio de Cali-Colombia. Memorias VII Congreso Latinoamericano de Micología, San José.
- Bononi, V.L.R., Oliveira, A.K.M., Quevedo, S.R. & Gugliotta, A.M.** 2008. Fungos macroscópicos do Pantanal do Rio Negro, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Hoehnea* 35: 489-511.
- 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.
- Botina, J.R. & García, L.** 2005. Árboles y arbustos del ecoparque Río Pance. Corporación. Autónoma Regional del Valle del Cauca CVC, Corporación para la recreación popular, Fondo para la Acción Ambiental. Santiago de Cali.
- Brazolin, S.** 2009. Bioteroração, anatomia do lenho e análise de risco de queda de árvores de Tipuana, *Tipuana tipo* (Benth.) O. Kuntze, nos passeios públicos de São Paulo, SP. PhD. Tese Universidade de São Paulo.
- Broda, P., Birch, P., Brooks, P. & Sims, P.** 1995. PCR-Mediated Analysis of Lignocellulolytic Gene Transcription by *Phanerochaete chrysosporium*: Substrate-Dependent Differential Expression within Gene Families. *Applied and Environmental Microbiology* 6: 2358-2364.
- Buchanan, P.K. & Wilkie, J.P.** 1999. Taxonomy of New Zeland *Ganoderma*. Two non-laccate species. *in*: P, K. Buchanan, R.S. Hseu & J. M. Moncalvo (Ed.), *Ganoderma: Systematics, Phytopathology and Pharmacology*. Proceedings of contributed Symposia 59A, B, 5TH International Mycological Congress. Vancouver, pp. 14-21.
- Canon, P.F. & Kirk, P.M.** 2007. Fungal families of the world. 1^a ed. Cabi Publishing. New York.

- Cao, Y., Wu, S.H. & Dai, Y-C.** 2012. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom “*Lingzhi*”. *Fungal Diversity* 56:49-62.
- Chang, S.T. & Miles, P.G.** 2004. Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. 2 ed. CRC Press, New York.
- Chen, C.S.** 1993. Methods for inducing various morphological fruiting body of *Ganoderma tsugae* Murr. *Trans. Mycol. Soc. Republ. China* 8: 9-16.
- Chen, C.S., Chang, H. & Kirk, T.K.** 1982. Aromatic-acids produced during degradation of lignin in spruce wood by *Phanerochaete chrysosporium*. *Holzforschung* 36:3-9.
- Chen, S., Xu, J., Chang, L., C.H., Yingjie. Z., Nelson, D.R., Zhou, S., Li, C., Wang, L., G, Xu., Sun, Y., Luo, H., Li. Y., Y. Song, J., Henrissat, B., Levasseur, A., Qian, Jun, Q., Li, J., Luo, X., Shi, L. ; He, L., Li, X., Xu, X., Yunyun, N., Li, Q., Han, M.V., Yan, H., Zhang, J., Chen, H. , Aiping, L. , Wang, Z., Liu, M.; Schwartz, D.C. & Sun, C.** 2012. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nat. Commun.* 3: 913.
- Corner, E.J.H.** 1983. Ad Polyporaceas I. *Amauroderma* and *Ganoderma*. *Beheif. Nova Hedw.* 75: 1-182.
- Dagma** 2009. Manual de Arborización Urbana-Guía práctica para la selección, siembra, cuidado y producción de árboles y palmas para zonas blandas y parques de Santiago de Cali. Santiago de Cali. <https://www.academia.edu/> (Acesso em 03/02/2016).
- Donk, M. A.** 1933. Revision der Niederlandischen Homobasidiomycetae- Aphyllophoraceae II. *Med. Bot. Mus. Rijksuniv. Utrecht* 9: 1-27.
- Donk, M.A.** 1948. Notes on Malasian fungi. I *Bull. du Jard. Bot. Buitenzorg* 17:473-482.
- Douanla-Meli, C. & Langer, E.** 2009. *Ganoderma carocalcareus* sp. nov., with crumbly-friable context parasite to saprobe on *Anthocleista nobilis* and its phylogenetic relationship in *G. resinaceum* group. *Mycol. Prog.* 8:145-155.

Drescheler-Santos, E.R., Gilbertoni, T.B., Goes-Neto, A. & Calvacanti, M.A. O. 2009. A re-evaluation of the lignocellulolytic Agaricomycetes from the Brazilian Semi-arid region. *Mycotaxon* 108: 241-244.

Drescheler-Santos, E.R., Groposo, C. & Loguercio-Leite, C. 2008. Additions to the knowledge of lignocellulolytic Basidiomycetes in forest from Santa Catarina, Southern Brazil. *Mycotaxon* 103: 197-200.

Eastwood, D.C., Floudas, D., Binder, M., Majcherczyk, A., Schneider, P., Aerts, A., Asiegbu, F.O., Baker, S.E., Barry, K., Bendiksby, M., Blumentritt, M., Coutinho, P.M., Cullen, D., de Vries, R.P., Gathman, A., Goodell, B., Henrissat, B., Ihrmark, K., Kauserud, H., Kohler, A., LaButti, K., Lapidus, A., Lavin, J.L., Lee, Y.-H., Lindquist, E., Lilly, W., Lucas, S., Morin, E., Murat, C., Oguiza, J.A., Park, J., Pisabarro, A.G., Riley, R., Rosling, A., Salamov, A., Schmidt, O., Schmutz, J., Skrede, I., Stenlid, J., Wiebenga, A., Xie, X., Kües, U., Hibbett, D.S., Hoffmeister, D., Högberg, N., Martin, F., Grigoriev, I.V. & Watkinson, S.C. 2011. The Plant Cell Wall–Decomposing Machinery Underlies the Functional Diversity of Forest Fungi. *Science* 333: 762-765.

Elisashvili, V. & Kachlishvili, E. 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* 144:37-42.

Fernández, A.J., Reis, L.A.M. & Carvalho, A. 2002. Caracterização do meio físico. In: D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (orgs.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste a urbanização de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo pp. 51-62.

Ferraz, A. 2004. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia *In:* E. Azevedo (EDUCS). Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. Caxias do Sul 215-242.

Fidalgo, M.E.P.K. 1968. Contribution to the fungi of Mato Grosso, Brazil. *Rickia* 3: 171-219.

- Fidalgo, O. & Bononi, V. L.** 1984. Técnicas de Coleta, Preservação e Herborização de Material Botânico. Instituto de Botânica. São Paulo. 62 p.
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martínez, A.T., Otilar, R., Spatafora, J.W., Yadav, J.S., Aerst, A., Isabelle Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P.M., de Vries, R.P., Ferreira, P., Findley, K., Foster, B., Gaskell, J., Glotzer, D., Górecki, D.P., Heitman, J. & Hori, C.** 2012. The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes. *Science* 336 (29): 1715-1719. www.sciencemag.org. (acesso em 05-01-2016)
- Fundação Florestal** 2012. Unidades de conservação. Disponível em <http://www.fflorestal.sp.gov.br/hotsites/hotsite/sobre.php>(acesso em 02/03/2016).
- Fungaro, M.H.P.** 2000. PCR na Micologia. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 14: 12-16.
- Furtado, J.S.** 1962. Structure of the spore of Ganodermataceae Donk. *Rickia* 1:227-241.
- Furtado, J. S.** 1965. Relation of microstructures to the taxonomy of the Ganodermoideae (Polyporaceae) with special reference to the structure of the cover of the pilear surface. *Mycologia* 57: 588-611.
- Furtado, J. S.** 1967. Some tropical species of *Ganoderma* (Polyporaceae) with pale contexto. *Persoonia* 4: 379- 389.
- Gallardo, M.H.** 2011. Evolución el curso de la vida. Buenos Aires, 1 ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Gerber, A.L.** 1996. Fungos xilófilos poroides (Aphylophorales) no morro da Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina. *Insula* 25: 3-68.
- Gerber, A.L. & Loguercio-Leite, G.** 1997. New records of Polypores (Aphylophorales) from Southern Brazil. *Mycotaxon* 62: 305-318.

- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. & Sannia, G.** 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67:369-85.
- Gilbertoni, T.B. & Cavalcanti, C.** 2003. A micological survey of the Aphyllophorales (Basidiomycotina) of the Atlantic Rain Forest in the state of Pernambuco, Brazil. *Mycotaxon* 87: 203-211.
- Gilbertoni, T.B. & Drescheler-Santos, E.R.** 2010. Lignocellulolytic Agaricomycetes from de Brazilian Cerrado biome. *Mycotaxon* 111:87-90.
- Gilbertson, R. I. & Ryvardeen, L.** 1986. North American Polypores. Part 1. Fungiflora, Oslo.
- Góes-Neto, A.** 1999. Polypore diversity in the state of Bahia, Brazil: A historial review. *Mycotaxon* 72: 43-56.
- Góes-Neto, A., Marques, M.F.O., Andrade, J.D. & Santos, D.S.** 2003. Lignicolous aphyllophoroid Basidiomycota in an Atlantic forest fragment in the semi-arid Caatinga region of Brazil. *Mycotaxon* 88: 359-364.
- Gold, M.H. & Alic, M.** 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews* 57:605-22.
- Gomes-Silva, A.C., Ryvardeen, L., Gilbertoni, T. B.** 2011. New records of Ganodermataceae from Brazil. *Nova Hedwigia* 92: 83-94.
- Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczynsky, A., Fekete, F., Krishnamurthy, S., Jun, L.E. & Xu, G.** 1997. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolate from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *J. Biotechnol.* 53: 133-152.
- Gottlieb, A.M., Ferrer, E. & Wright, J.E.** 2000. rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma*. *Micol. Res.* 104:1033-1045.

- Gottlieb, A.M., Saidman, Z.O. & Wright, J.E.** 1998. Isoenzymes of *Ganoderma* species from southern South America. *Mycol. Res.* 102: 415-426.
- Gottlieb, A.M. & Wright, J.E.** 1999a. Taxonomy of *Ganoderma* from Southern South America: Subgenus *Ganoderma* *Mycol. Res.* 103: 661-673.
- Gottlieb, A.M. & Wright, J.E.** 1999b. Taxonomy of *Ganoderma* from Southern South America: Subgenus *Elfvigia*. *Mycol. Res.* 103: 1289-1298.
- Groposo, C. & Loguercio-Leite, C.** 2005. Contribution to the lignocellulolytic fungi (Basidiomycetes) of the Atlantic Rain Forest in Southern Brazil. *Mycotaxon* 92: 103-106.
- Gugliotta, A. M., Abrahão, M. C. & Gilbertoni, T. B.** 2013. Polyporales. In Lista de Espécies da Flora do Brazil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (Disponível em <http://floradoBrazil.jbrj.gov.br/jabot/floradoBrazil/FB92411> (acesso em 20-II- 015)).
- Gugliotta, A. M., Poscolere, G.D. & Silva, T.V.** 2011. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. *Fungos*, 10: Ganodermataceae. *Hoehnea* 38: 687-695.
- Haddow, W. R.** 1931. Studies in *Ganoderma*. *Jour. Arnold Arb.* 12: 25-46.
- Hakulinen, N., Kiiskinen, LL., Kruus, K., Saloheimo, M., Pananen, A., Koivula, A. & Rouvinen, J.** 2002. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nat. Struct. Biol.* 9: 601-605.
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 41:95-88.
- Hatakka, A.** 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 125-135.
- Hawksworth, D.I.** 2012. Integrating morphological and molecular data in fungal systematics. In: J.K. Misra, J.P. Tewari & S.K. Deshmukh (eds.). *Systematics and evolution of fungi*. CRC Press. New York, pp. 1-14.

Heim, R. 1962. Organization architecturale des spores de Ganodermes. *Revue Mycol.* 27:199-212.

Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lucking, R., Lumbsch, T., Lutzoni, F., Matheny, P.B., Mclaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K., Ironside, J.E., Koljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schu ler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Wei , M., White, M.M., Winka, K., Yao Y.J. & Zhang, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111: 509-547

Hibbett, D. & Donoghue, M. 1995. Progress toward a phylogenetic classification of the Polyporaceae through parsimony analyses of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Can. J. Bot.* 73: 853-861.

Ho, Y.W. & Nawawi, A. 1985. *Ganoderma boninense* Pat. from basal stem rot of oil palm (*Elaeis guineensis*) from peninsular Malaysia. *Pertanika* 4: 425-428.

Hong, S.H. & Jung, H.S. 2002. Amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of polypores and its potential for phylogenetic analysis. *Mycologia* 94:823-833.

Hong, S.G. & Jung, H.S. 2004. Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 96: 742-755.

Hseu, R.S. 1990. An identification system for cultures of *Ganoderma* species. PhD thesis, National Taiwan University. Taiwan.

- Hushiarian, R., Yusof, N. A. & Dutse, S.W.** 2013. Detection and control of *Ganoderma boninense*: strategies and perspectives. Springer 2:555.
- Imazeki, R.** 1939. Studies in *Ganoderma* of Nippon. Bull. Tokyo Sci. Mus. 1: 29-52.
- Imazeki, R.** 1952. A contribution to the fungus flora of Dutch New Guinea. Bull. Govt. Forest. Exp. St. Tokyo 57: 87-128.
- Janusza, G., Kucharzyk, H.K., Pawlika, A., Staszczaka, M., & Paszczynskic, A.J.** 2013. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. Enzyme and Microbial Technology 52: 1-12.
- Jo, W.S, Park, H.N., Cho, D.H., Yoo, Y.B. & Park, S.C.** 2011. Detection of Extracellular Enzyme Activities in *Ganoderma neo-japonicum*. Mycobiology 39:118-120.
- Justo, A. & Hibbett, D.S.** 2011. Phylogenetic classification of *Trametes* (Polyporales, Basidiomycota) based on a five marker dataset. Taxon 60:1567-1583.
- Kandan, A., Radjacommare, R., Ramanathan, A., Raguchander, T., Balasubramanian, P. & Samiyappan, R.** 2009. Molecular Biology of *Ganoderma* Pathogenicity and Diagnosis in Coconut Seedlings. Folia Microbiol. 54: 147-152.
- Karsten, P.A.** 1881. Enumeratio Boletinearum et Polyporearum Fennicarum, Systemate novo Dispositarum. Rev. Mycol. 3:16-19.
- Kirk, T.K.** 1981. Toward elucidating the mechanism of action of the ligninolytic system in basidiomycetes. New York: Forest Products Laboratory, Forest Service U.S. Dept. of Agriculture.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. & Stalpers, J.A.** 2008. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 10th ed. CAB International, Wallingford.
- Korbie, D.J. & Mattick, J.S.** 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. Nature protocols. Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland, St Lucia, Australia.

- Kurihara, D. I., Imaña-Encinas, J. & Paula, J. E.** 2005. Levantamento da arborização do campus da Universidade de Brasília. *Cerne*, Lavras 2: 127-136.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W. & Guindon, S.** 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1695-1701. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mss020>.
- Li, J., Zhang, J., Chen, H., Chen, X.Q., Lan, L. & Liu, C.** 2013. Complete mitochondrial genome of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *PLoS ONE* 8:1-11.
- Lim, T.** 1977. Production, germination and dispersal of basidiospores of *Ganoderma pseudoferreum* on *Hevea*. *Journal of the Rubber Research Institute Malaysia* 25:93-9.
- Lima de Toledo, B.** 2004. São Paulo: três cidades em um século. Ed. Cosac e Naify, São Paulo.
- Lima, N.J., Baptista, G., & Malosso, E.** 2014. Delimitation of some Neotropical laccate *Ganoderma* (Ganodermataceae): molecular phylogeny and morphology. *Rev. Biol. Trop.* 62: 1197-1208.
- Loguercio-Leite, C.** 2005. Contribution to the lignocellulolytic fungi (Basidiomycetes) of the Atlantic Rain Forest in Southern Brazil. *Mycotaxon* 92: 103-106.
- Loguercio-Leite, C., Groposso, C. & Halmenschlager, M.A.** 2005. Species of *Ganoderma* Karsten in a subtropical area (Santa Catarina State, Southern Brazil). *Iheringia, sér. Bot.* 60:135-139.
- Loguercio-Leite, C.N. & Wright, J.E.** 1991. Contribution to a biogeographical study of the Austro-American Xylophilous Polypores (Aphyllporales) from Santa Catarina. *Mycotaxon* 41: 161-166.
- Lohwag, H.** 1941. Anatomie der Asco-und Basidiomycetes. Berlin-Nikolassee, Gebr. Borntraeger. 572 p.

- Machado, K.M.G., Matheus, D. R. & Bononi, V.L.R.** 2005. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue R decolorization by tropical Brazilian Basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 36:246-252.
- Mantovani, A. & Sica, A.** 2010. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* 22: 231-237.
- Matheny, P.B., Wang, Z., Binder, M., Curtis, J.M., Woon Lim, Y.W., Nilsson, R.H., Hughes, K.W., Hofstetter, V., Ammirati, J.F., Schoch, C.L., Langer, E., Langer, G., McLaughlin, D.J., Wilson, A.W., Frøslev, T., Wei Ge, Z-W., Kerrigan, R.W., Slot, J.C., Yang, Z-L.; Baroni, T.J., Fischer, M., Hosaka, K., Matsuura, K., Seidl, M. T., Vauras, J. & Hibbett, D.S.** 2007. Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 430-45.
- Meijer, A.A.R.** 2001. Mycological Work in the Brazilian state of Paraná. *Nova Hedwigia* 72:105-159.
- Meijer, A.A.R.** 2006. Preliminary list of the Macromycetes from the Brazilian state of Paraná. *Boletim do Museu Botânico Municipal Curitiba* 68:1-55.
- Miettinen, O., Larsson, E., Sjökvist, E. & Larsson, K.L.** 2011. Comprehensive taxon sampling reveals unaccounted diversity and morphological plasticity in a group of dimitic polypores (Polyporales, Basidiomycota). *Cladistics* 28:251-7270.
- Milagres, A.M.F., Arantes, V., Medeiros, C.L. & Machuca, A.** 2002. Production of metal chelating compounds by white and brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching. *Enzyme and Microbial Technology* 30:562-565.
- Milagres, A.M.F., Machuca, A. & Napoleão, D.** 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods* 37:1–6.

- Moncalvo, J. M.** 2000. Systematics of *Ganoderma*. In: J. Flood, P.D. Bridge, & M. Holderness (eds.). *Ganoderma* disease in perennial crops. CABI publishing, New York, pp. 23-46.
- Moncalvo, J.M. & Buchanan, P.K.** 2008. Molecular evidence for long distance dispersal across the Southern Hemisphere in the *Ganoderma applanatum-australe* species complex (Basidiomycota). *Mycological Research* 111:425-436.
- Moncalvo, J.M. & Ryvarden, L.** 1997. A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk. *Synopsis Fungorum* 11, Fungiflora, Oslo.
- Moncalvo, J.M., Wang, H-F., Hseu, R-S.** 1995a. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87: 223-238.
- Moncalvo, J.M., Wang, H-F., Hseu, R-S.** 1995b. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. *Mycol. Res.* 99: 1489-1499.
- Murrill, W.A.** 1902. The Polyporaceae of North America. I. The genus *Ganoderma*. *Bull. Torr. Bot. Club* 29: 599-608.
- Murrill, W. A.** 1905a. The Polyporaceae of North America. XI. A synopsis of the brown pileate species. *Bull. Torrey Bot. Club* 32: 353-371.
- Murrill, W.A.** 1905b. *Tomophagus* for *Dendrophagus*. *Torreyia* 5:197.
- Murrill,** 1920. Corrections and additions to the Polypores of temperate North America. *Mycologia* 12:6-24.
- Naher, L., Yusuf, U.K., Ismail, A., Tan, S.G. & Mondal, M-M.A.** 2013. Ecological status of *Ganoderma* and basal stem rot disease of oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Australian Journal of Crop Science* 7:1723-1727.

- Nakasone, K.K.** 1990. Cultural studies and identification of wood-inhabiting Corticiaceae and selected Hymenomycetes from North America. *Micologia Memoir* 165:1-412.
- Nascimento, L., Queiroz-Cavalcante, M.A., Fontes-Urben, A. & Cortopassi-Buso, G.S.** 2011. Use of RAPD molecular markers on differentiation of Brazilian and Chinese *Ganoderma lucidum* strains. *Brazilian archives of Biology and Technology* 54:273-281
- Nobles, M. K.** 1948. Studies in forest pathology. VI. Identification of culture of wood-rotting fungi. *Canadian Journal of Research* 26: 281-431.
- Nobles, M.K.** 1958. Cultural characters as a guide to the taxonomy and phylogeny of the *Polyporaceae*. *Canadian Journal of Botany* 26: 883-926
- Nobles, M.K.** 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Canadian Journal of Botany* 43: 1097-1139.
- Okino, L.K., Machado, K.M.G., Fabris, C. & Bononi, V.L.R.** 2000. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 889-893.
- Ommelna, B.G., Jennifer A.N. & Chong, K.P.** 2012. The potential of chitosan in suppressing *Ganoderma boninense* infection in oil-palm seedlings. *J. Sustain Sci. Manage* 7:186-192.
- Patouillard, N.** 1889. Le genre *Ganoderma*. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 5:64-80.
- Pegler, D.N. & Young, T.W.K.** 1973. Basidiospore form in the British species of *Ganoderma* Karst. *Kew. Bull.* 28: 351-369.
- Prefeitura Municipal de Ubêrlandia** 2009. Plano local de habitação de interesse social de uberlândia, diagnóstico estratégico de habitação de interesse social. Ubêrlandia.
- Prefeitura de São Paulo Secretaria do Verde e do Meio Ambiente.** 2015. Manual Técnico de Arborização urbana. São Paulo.

- Pilotti, C.A., Sanderson, F.R. & Aitken, E.A.B.** 2003. Genetic structure of a population of *Ganoderma boninense* on oil palm. *Plant. Pathol.* 52: 455-463.
- Pilotti, C.A., Sanderson, F.R., Aitken, E.A.B. & Armstrong, W.** 2004. Morphological variation and host range of two *Ganoderma* species from Papua New Guinea. *Mycopathologia* 158: 251-265.
- Pribnow, D., Mayfield, M.B., Nipper, V.J., Brown, J.A. & Gold, M.H.** 1989. Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase, from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry* 264:5036-5040.
- Pivetta, K.F.L. & Silva Filho, D.F.** 2002. Arborização Urbana. Boletim acadêmico. Disponível em http://http://www.uesb.br/flower/alunos/pdfs/arborizacao_urbana%20Khatia.pdf. (Acesso em 26-12-15).
- Raeder, U. & Broda, P.** 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1: 17-20.
- Rajchernberg, M. & Meijer, A.A.A.** 1990. New and noteworthy Polypores from Parana and São Paulo states, Brazil. *Mycotaxon* 38:173-185.
- Renganathan, V. & Gold, M. H.** 1986. Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular heme enzyme from the white rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 25: 1626-1631.
- Richter, C., Wittstein, K., Kirk, P.M. & Stadler, M.** 2015. An assessment of the taxonomy and chemotaxonomy of *Ganoderma*. *Fungal Diversity* 71:1-15.
- Ryvarden, L.** 1991. Genera of Polypores. Nomenclature and taxonomy. *Synopsis Fungorum* 5: 1-363.

- Ryvarden, L.** 1995. Can we trust morphology in *Ganoderma*?. In: P.K., Buchanan, R.S. Hseu, & J.M. Moncalvo (Eds.) *Ganoderma: Systematics, Phytopathology and Pharmacology*. Proceedings of contributed symposia 59A, B. Fifth International Mycological Congress, Vancouver, pp. 19-24.
- Ryvarden, L.** 2000. Studies in neotropical polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia* 92:180-191.
- Ryvarden L.** 2004. Neotropical Polypores: Part 1. Introduction, Ganodermataceae & Hymenochataceae. *Synopsis Fungorum* 19: 1-227.
- Ryvarden, L. & Gilbertson, R.L.** 1993. European Polypores 1. *Synopsis Fungorum* 6:1-387.
- Ryvarden, L. & Johansen, I.** 1980. A preliminary polypore flora of East Africa. *Fungiflora*, Oslo.
- Salazar, A.M. & Palacios, N.** 2003. Mecanismos adaptativos a amenazas por inundaciones en el Municipio de Cali, caso Río Cauca. Tesis de maestría. Universidad del Valle. Cali.
- Sankaran, K.V., Bridge, P.D. & Gokulapalan, C.** 2005. *Ganoderma* diseases of perennial crops in India – an overview. *Mycopathologia* 159: 143-152.
- Sanodiya, B.S., Thakur, G.S., Baghel, R.K., Prasad, G.B. & Bisen, P.S.** 2009. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10: 717-742.
- Santos, P.M. & Funari, F.L.** 2002. Clima. In: Bicudo, D.C., Forti, M.C. & Bicudo C.E.M. (orgs.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, São Paulo, pp 141-158.
- Schwyn, B. & Neilands, J.B.** 1997. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 46-56.
- Secretaria do Meio Ambiente.** 2006. Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar. Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.

- Secretaria do Meio Ambiente.** 2000. Atlas das unidades de conservação ambiental do estado de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.
- Sjokvist, E., Larsson, E., Eberhardt, U., Ryvarden, L. & Larsson, K.H.** 2012. Stipitate steriod basidiocarps have evolved multiple times. *Mycologia* 104:1046-1055.
- Silva, M. & Minter, D.W.** 1995. Fungi from Brazil recorded by Batista and Co-workers. *Mycol. Pap.* 169: 1-585.
- Simone, D. & Nnesi, T.** 2012. Occurrence of *Ganoderma adspersum* on *Pinus pinea*. *Phytopath. Mediter.* 51: 374-382.
- Souza, D.L. & Santos, N. O.** 2008. Arborização urbana das praças de Cachoeira do Sul-RS-Brasil: fitogeografia, diversidade e índice de áreas verdes. *Pesq. Bot.* 59: 307-320.
- Stajic, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S.P., Nevo, E. & Vukojevic, J.** 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 65-73.
- Stalpers, J.A.** 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *Studies in Mycology* 16: 1-248.
- Steyaert, R.L.** 1961. Note on the nomenclature of fungi and incidently of *Ganoderma lucidum*. *Taxon* 10:251-252.
- Steyaert, R.L.** 1962. Genus *Ganoderma* (Polyporaceae). *Taxa Nova II. Bull. Jard. Bot. Etat Brux.* 32:89-104.
- Steyaert, R.L.** 1967a. Les *Ganoderma* palmicoles. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 37: 465-492.
- Steyaert, R.L.** 1967b. Considerations generals sur le genre *Ganoderma* et plus specialment sur les espèces Européenees. *Bull. Soc. Roy. Belg.* 100:189-211.
- Steyaert, R. L.** 1972. Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bogor and Leiden herbaria. *Persoonia* 7: 55-118.

- Steyaert, R. L.** 1975. The concept and circumscription of *Ganoderma tornatum*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 65: 451-467.
- Steyaert, R. L.** 1977. Basidiospores of two *Ganoderma* species and others of two related genera under the scanning electron microscope. Kew. Bull. 31: 437- 442.
- Steyaert, R.L.** 1980. Study of some *Ganoderma* species. Bull. Jard. Bot. Nat. Belg. 50:135-186.
- Swofford, D.L.** 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- Teixeira, A. R.** 1962a. The taxonomy of the Polyporaceae. Biol. Rev. 37: 51-81.
- Teixeira A. R.** 1962b. Microestructures do carpóforo e sistemática do gênero *Fomes* (Fries) Kickx. Rickia 1: 15-93.
- Thompson, A.** 1931. Stem rot of the oil palm in Malasia. Bulletin of Department of Agriculture, Science Series, 23 p.
- Tompong, S. & Kunasakdakul, K.** 2014. Causal agent, symptoms and environmental factors of root rot disease of organic tea in Mae Taeng district, Chiang Mai province. Journal of Agricultural Technology 10: 767-777.
- Torrend, C.** 1920. Les polyporacées du Brésil I. Le genre *Ganoderma*. Brotéria, ser. Bot 18:23-43.
- Torres-Torres M.G., Guzmán-Dávalos, L. & Gugliotta, A.M.** 2008. *Ganoderma viviamercedianum* sp. nov. and related species *G. perzonatum*. Mycotaxon 105: 447-454.
- Torres-Torres, M.G., Guzmán-Dávalos, L. & Gugliotta, A.M.** 2012. *Ganoderma* in Brazil. Mycotaxon 121: 93-132.
- Turner, P. D.** 1981. Oil Palm Diseases and Disorders. Oxford University Press, UK.
- Utomo, C. & Niepold, F.** 2000. Development of diagnostic methods for detecting *Ganoderma* infected oil palms. J. Phytopathol. 148:507-514.

- Vasco-Palacios, A.M. & Franco-Molano, A.E.** 2013 Diversity of Colombian Macrofungi (Ascomycota-Basidiomycota). *Mycotaxon* 121: 499.
- Vilgalys, R. & Hester, M.** 1990. Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from several *Cryptococcus Species*. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246.
- Vilgalys, R. & Sun, B. L.** 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 4599-4603.
- Vitali, V.M.V., Machado, K.M.G., Andrea, M.M., & Bononi, V.L.R.** 2006. Screening for mitosporic fungi for organochlorides degradation. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:256-261.
- Wang, X.C., Shao, J. & Liu, C.** 2015a. The complete mitochondrial genome of the medicinal fungus *Ganoderma applanatum* (Polyporales, Basidiomycota). Mitochondrial DNA. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (acesso em 20-11-2015).
- Wang, X.C., Wu, K., Chen, H., Shao, J., Zhang, N., Chen, X., Lan, J. & Liu, C.** 2015b. The complete mitochondrial genome of the white-rot fungus *Ganoderma meredithiae* (Polyporales, Basidiomycota). Mitochondrial DNA. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (acesso em 10-X-2015).
- Westphalem, M.C., Reck, M.A. & Silveira, R.M.B.** 2010. *Ganoderma chaliceum* and *Junghuhnia meridionalis*: new records from Brazil. *Mycotaxon* 111:11-18.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. & Taylor, J.W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: N. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky & White T.J (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego, pp. 315-322.

- Wong, D.W.S.** 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. Appl. Biochem. Biotechnol. 157:174-209.
- Wong, L-C., Bong, C-F.J. & Idris, A.S.** 2012. *Ganoderma* species associated with basal stem rot disease of oil palm. American Journal of Applied Sciences 9: 879-885.
- Yeh, XY.** 1990. Taxonomy study of *Ganoderma australe* complex in Taiwan. PhD Thesis. National Taiwan University.
- Zakaria, L., Harikrishna, K., Guan, T.S., Abdullah, F. & Wan, Y.H.** 2005. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and random amplified microsatellite (RAMS) of *Ganoderma* from infected oil palm and coconut stumps in Malaysia. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 13: 23-34.
- Zhang, X.Q., Ip, F.C., Zhang, D.M., Chen, L.X., Zhang, W., Li, Y.I., Ip, N.Y. & Ye, W.C.** 2011. Triterpenoids with neurotropic activity from *Ganoderma lucidum*. Nat. Prod. Res. 25:1607-1613.
- Zhao, J.D.** 1989. The Ganodermataceae in China. Bibliotheca Mycologica 132: 1-176.
- Zhao, J.D., Xu, L.W. & Zhang, X.Q.** 1979. Taxonomic studies on the subfamily Ganodermatoideae of China. Acta Microbiol. Sin. 19: 265-279.
- Zhao, J.D. & Zhang, X.Q.** 2000. Flora fungorum sinicorum. vol.18, Ganodermataceae. Beijing: Science Press. pp. 1-178.
- Zhou, X-W., Cong, W-R., Su Q-K. & Zhang, Y-M.** 2012. Ligninolytic enzymes from *Ganoderma* spp: current status and potential applications. Critical Reviews in Microbiology 39: 416-426.