



Sistemática e Biologia de
Políporos do Sul do Brasil:
gêneros *Antrodiella*, *Junghuhnia*
Flaviporus e *Tyromyces*

Mauro C. Westphalen

Orientadora: Adriana de Mello Gugliotta
Co-orientador: Mario Rajchenberg



MAURO CARPES WESTPHALEN

**Sistemática e Biologia de Políporos do Sul do
Brasil: gêneros *Antrodiella*, *Flaviporus*,
Junghuhnia e *Tyromyces***

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

MAURO CARPES WESTPHALEN

**Sistemática e Biologia de Políporos do Sul do
Brasil: gêneros *Antrodiella*, *Flaviporus*,
Junghuhnia e *Tyromyces***

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: DRA. ADRIANA DE MELLO GUGLIOTTA

CO-ORIENTADOR: DR. MARIO RAJCHENBERG (CIEFAP)

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

Westphalen, Mauro Carpes
C519s Sistemática e biologia de políporos do Sul do Brasil: gêneros *Antrodiella*,
Flaviporus, *Junghuhnia* e *Tyromyces* / Mauro Carpes Westphalen -- São Paulo, 2016.
146p. il.

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

1. Micodiversidade. 2. Filogenia. 3. Taxonomia. I. Título.

CDU: 582.28

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar este trabalho a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram ou estiveram presentes durante esses quatro anos.

À Prof. Adriana de Mello Gugliotta, pela disponibilidade, apoio e orientação durante estes anos e por toda a ajuda nos momentos de desespero, companhia nas coletas e pela amizade.

Ao meu co-orientador, Dr. Mario Rajchenberg, sem o qual este trabalho nunca teria acontecido. Obrigado pela orientação, discussões, por todos os ensinamentos sobre micologia, mas principalmente agradeço ao Mario e sua esposa Viviana Katz pela amizade, conversas e por sempre me receberem de portas abertas (literalmente).

To Dr. Michal Tomšovský, for all the help with the articles and the molecular biology analysis, and especially for always being available and interested to help when I needed and for all the support during my stay in Brno.

To Lukas and Kazik, for the company during those years, the talks, for all the help, for showing interest about my work and listening to my boring talks about polypores and sequences and especially for always caring.

Aos colegas micólogos do Instituto de Botânica, pelas conversas e discussões. Aos amigos e colegas de laboratório, em especial a Ana Cristina Bolaños, pela companhia e conversas ao longo destes anos, Ricardo Pires, pela amizade, companhia nas coletas e por sempre estar disposto a ajudar, e a Viviana Motato-Vasquez, obrigado convivência, amizade e companhia durante todo este tempo e por ter me recebido tão bem quando cheguei meio sozinho e perdido em São Paulo.

A todos os pesquisadores do Instituto de Botânica, sobretudo do Núcleo de Pesquisa em Micologia, pelo ótimo convívio e ensinamentos durante estes anos. Um agradecimento especial a Dra. Vera Vitali, sempre disposta a ajudar, a melhor motorista e ótima companheira de coletas, obrigado pela amizade, conversas e pelos bolos.

Aos funcionários do Instituto de Botânica, sobretudo do Núcleo de Pesquisa em Micologia, e do programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, pela infraestrutura e suporte oferecidos.

Aos pesquisadores de outras universidades que de alguma forma contribuíram com este trabalho, em especial a Dra. Rosa Mara Borges da Silveira, Dr. Elisandro Ricardo Drechsler-Santos, Dra. Maria Alice Neves e Dr. Gerardo Robledo.

Aos colegas e amigos micólogos de diversas universidades que me acompanharam em coletas, em especial Paula Santos Silva, Letícia Osório da Rosa, Camila Alves, Juliano Marcon Baltazar, Larissa Trierveiler Pereira e Marisa Campos Santana. Um agradecimento especial ao amigo Mateus Arduvino Reck, sem o qual muitas das coletas não teriam sido possíveis, obrigado pelas conversas, ajuda e pela companhia.

Aos funcionários do Herbário SP, pela ajuda e disponibilidade, e aos curadores e funcionários de todos os herbários que forneceram empréstimos de materiais para este trabalho, sobretudo ICN, FLOR, PACA, NY, O, S e K.

À FAPESP, que financiou este trabalho (processo 2011/17219-0), possibilitando as coletas em diversas áreas e o Estágio de Pesquisa no Exterior (processo 2014/06575-8).

Por último gostaria de agradecer à minha família (a de sangue e a que encontrei durante os anos), que mesmo longe sempre estiveram muito presentes dando apoio, compreensão e amor. Aos meus pais, irmãos e amigos, que nunca desistem de mim.

RESUMO

O termo políporo é utilizado para denominar os fungos do filo Basidiomycota que apresentam himenóforo tubular. Estes fungos formam um grupo polifilético, estando incluídos em diversas ordens da classe Agaricomycetes, sendo Polyporales a maior delas. Dentro desta ordem, os gêneros *Antrodiella*, *Flaviporus*, *Junghuhnia* e *Tyromyces* se caracterizam por serem causadores de podridão branca na madeira, pela presença de sistema hifal mono a dimítico com hifas generativas fibuladas e pelos basidiósporos hialinos e pequenos. Estudos moleculares demonstraram o alto grau de polifiletismo desses gêneros, no entanto até o momento poucas espécies neotropicais foram incluídas em análises filogenéticas. Além disso, pouco ou nada se conhece a respeito de suas características biológicas, tal como polaridade sexual e comportamento nuclear, que podem ser importantes ferramentas na separação de gêneros morfológicamente semelhantes. Este estudo teve como objetivo auxiliar neste quadro, incrementando o conhecimento da diversidade e distribuição dos quatro gêneros no Brasil, fornecendo dados morfológicos, moleculares e biológicos para uma melhor compreensão de sua sistemática. As coletas foram realizadas nos estados do RS, SC, PR e SP e todos os materiais foram analisados morfológicamente. Coleções de materiais tipo, bem como outros espécimes de herbários, foram estudadas para comparação e confirmação das identificações. Culturas polispóricas e monóspóricas foram obtidas e utilizadas para técnicas de coloração de núcleo e testes de compatibilidade. Para as análises moleculares, sequências obtidas das regiões ITS, LSU, *tef1- α* e *rbp2* foram utilizadas para construção de árvores filogenéticas aplicando inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança. Os moleculares obtidos confirmam o alto polifiletismo do grupo, apresentando espécies distribuídas em diversos gêneros nos clados phlebioide e residual poliporoide. As análises morfológicas e filogenéticas revelaram a ocorrência de 24 espécies do grupo estudado, sendo que destas seis são novas para a ciência e outras três necessitam de mais coletas para confirmar se representam novos táxons. Dois novos gêneros foram confirmados e são propostos e pelo menos sete novas combinações são necessárias para transferir espécies para os gêneros adequados. Além disso, foram obtidos dados biológicos de 12 espécies, representando um significativo incremento no conhecimento do grupo e, aliados às características morfológicas, uma ferramenta importante para a delimitação dos gêneros.

Palavras chave: políporos neotropicais, micodiversidade, filogenia, taxonomia.

ABSTRACT

The term polypore is used to denote the fungi belonging to Basidiomycota that present a tubular hymenophore. These fungi form a polyphyletic group and are included in several orders of Agaricomycetes, Polyporales being the largest of them. Within this order, the genera *Antrodiella*, *Flaviporus*, *Junghuhnia* and *Tyromyces* are characterized by causing white rot in dead wood, by the presence of mono-dimitic hyphal system with clamped generative hyphae and hyaline and small basidiospores. Molecular studies have shown that these genera are highly polyphyletic, but so far few Neotropical species have been included in phylogenetic analyzes. In addition, little or nothing is known about their biological characteristics, such as mating system and nuclear behavior, which may be important tools in the separation of morphologically similar genera. This study aims to contribute in this context, increasing the knowledge on the diversity and distribution of the four genera in Brazil, providing morphological, molecular and biological data for a better understanding of their systematics. Specimens were collected in the states of RS, SC, PR and SP and all materials were analyzed morphologically. Collections of type specimens, as well as other herbarium materials, were studied for comparison and confirmation of identifications. Polysporic and monosporic cultures were obtained and used for nuclear staining and compatibility tests. For the molecular analysis, sequences obtained of the ITS, LSU, *tef1- α* and *rbp2* regions were used to build phylogenetic trees by applying Bayesian Inference and Maximum Likelihood. Molecular data obtained confirmed the high polyphyletism of the group, with species distributed in several genera in the phlebioid and residual polyporoid clades. The morphological and phylogenetic analysis revealed the occurrence of 24 species of the studied group, six of them being new to science and other three requiring further sampling to confirm if they represent new taxa. Two new genera have been confirmed and are proposed and at least seven new combinations are needed to transfer species to the appropriate genera. Furthermore, biological data from 12 species were obtained, representing a significant increase in the knowledge on the group and, allied with morphological characteristics, an important tool for the delimitation of genera.

Keywords: neotropical polypores, micodiversity, phylogeny, taxonomy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico e taxonomia	2
1.2. Morfologia	3
1.3. Características Biológicas	5
1.4. Importância ecológica e econômica	7
1.5. Caracterização dos gêneros <i>Antrodiella</i> , <i>Flaviporus</i> , <i>Junghuhia</i> e <i>Tyromyces</i>	8
1.6. Estudos no Brasil e no mundo	9
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Área de estudo.....	13
3.2. Coleta de material	15
3.3. Herborização do material.....	15
3.4. Análises morfológicas	15
3.4.1. Análise macromorfológica	15
3.4.2. Análise micromorfológica	16
3.5. Identificação do material e revisão de herbários	17
3.6. Obtenção de culturas e estudos biológicos	18
3.6.1. Obtenção de esporadas.....	18
3.6.2. Obtenção de culturas polispóricas	18
3.6.3. Obtenção de culturas monospóricas.....	19
3.6.4. Determinação da polaridade sexual	19
3.6.5. Determinação do comportamento nuclear	20
3.7. Extração de DNA.....	21
3.7.1. Extração de DNA de culturas	21
3.7.2. Extração de DNA de basidiomas	22
3.8. Amplificação de DNA	22
3.8.1. PCR	22
3.8.2. Nested PCR.....	24
3.8.3. Eletroforese	24
3.8.4. Purificação de DNA e extração do gel.....	25

3.9. Sequenciamento do DNA	25
3.10. Análise dos dados	26
3.10.1. Alinhamento das sequências	26
3.10.2. Análises filogenéticas	26
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	27
4.1. Polaridade sexual e comportamento nuclear.....	30
4.2. Análises moleculares	34
4.2.1. Extração e amplificação de DNA	34
4.2.2. Análises filogenéticas	36
4.3. Táxons excluídos ou com posição dúbia	43
4.4. Artigos.....	46
CAPÍTULO I	47
CAPÍTULO II	63
CAPÍTULO III	80
CAPÍTULO IV	110
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
ANEXO I	136

1. INTRODUÇÃO

O reino Fungi é conhecido por incluir uma alta diversidade de organismos e, desde seu ancestral até as formas mais derivadas, possui a maior linhagem dentre os eucariotos (Blackwell 2011). Em um cálculo baseado na proporção fungos/plantas de 6:1 em regiões temperadas, estimou-se a ocorrência de cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, das quais apenas 5% foram formalmente descritas (Hawksworth 1991, 2001; Lodge 2001). Já Blackwell (2011) estima a diversidade fúngica em 5,1 milhões de espécies. Com base no estudo de Hawksworth (2001), que estima entre 1.000 e 1.200 espécies de fungos descritas por ano, Mueller & Schmit (2007) presumiram que cerca de 1.000 anos seriam necessários para o conhecimento da real diversidade fúngica do planeta. Kirk *et al.* (2008) salientam a diferença exorbitante entre o número de espécies de fungos descritas e estimadas e, segundo os autores, 16.013 novas espécies foram registradas no *Index of Fungi* entre os anos de 1981 e 1990, sendo de 60 a 85% destas provenientes de regiões tropicais. Segundo Lewinsohn & Prado (2005), cerca de 14.000 espécies de fungos são conhecidas no Brasil, enquanto as estimativas apontam para mais de 200.000 espécies. Estes dados demonstram a importância e a necessidade de estudos taxonômicos para que se conheça a diversidade de fungos, incluindo os políporos, sobretudo em regiões tropicais. Além disso, os fungos possuem reconhecido papel na biotecnologia e outras áreas aplicáveis da ciência, podendo ser importantes para o desenvolvimento de um mundo sustentável (Mueller *et al.* 2004; Lange 2011). Entretanto, para sua conservação e possíveis aplicabilidades, inventários micológicos são os primeiros passos a serem dados (Courtecuisse 2001; Mueller *et al.* 2004).

O termo políporo é utilizado para abranger os fungos basidiomicetes pertencentes à antiga ordem Aphyllophorales Rea que apresentam himenóforo tubular com superfície poróide (Ryvarden & Johansen 1980). São conhecidos popularmente como orelhas-de-pau e, juntamente com os representantes da ordem Agaricales Underw. (cogumelos), formam a maior parcela dos fungos macroscópicos conhecidos (Rossman 1994). Os fungos com poros apresentam uma ampla diversidade de formas, desde manchas no substrato, quando recebem a denominação de ressupinados, até formas pileadas (com um “chapéu”), estipitadas ou sésseis. Também se caracterizam por serem predominantemente degradadores de madeira, podendo decompor madeira morta ou também atacar árvores ainda vivas, atuando como parasitas.

1.1. Histórico e Taxonomia

Uma das primeiras classificações para os fungos, o *Systema Mycologicum*, foi elaborada por Fries (1821) e incluía os políporos na Tribo Polypori, formada por três gêneros, *Daedalea* Pers., *Polyporus* P. Micheli ex Adans e *Merulius* Fr. O nome Polyporaceae foi adotado mais tarde, também por Fries (1838), sendo utilizado para designar a família dos políporos verdadeiros. Posteriormente, o uso das características microscópicas na taxonomia dos Hymenomycetes foi implementado por Patouillard (1900). Rea (1922) propôs a ordem Aphyllophorales, que incluía os fungos clavarióides (Clavariaceae), teleforóides (Thelephoraceae), hidnóides (Hydnaceae) e poróides (Polyporaceae). Corner (1932) introduziu a análise do sistema hifal na taxonomia dos políporos, o que levou a grandes modificações na circunscrição de espécies e, sobretudo, gêneros desses fungos. Alexopoulos e Mims (1979) apresentaram um sistema de classificação de fungos que foi amplamente utilizado, ainda incluindo fungos com poros na ordem Aphyllophorales dentro de cinco famílias: Bondarzewiaceae Kotlaba & Pouzar, Fistulinaceae Litsy, Ganodermataceae Donk, Hymenochaetaeae Imazeki & Toki e Polyporaceae Corda.

Mais recentemente, a utilização de ferramentas moleculares causou e continua causando grandes modificações na classificação dos políporos, levando à revisão de conceitos morfológicos tradicionalmente utilizados na separação de espécies e gêneros. O grupo AFTOL (*Assembling the Fungal Tree of Life*) (Lutzoni *et al.* 2004), que reúne micologistas de vários países, vem realizando uma série de trabalhos filogenéticos, com auxílio de análises moleculares, morfológicas e de biologia reprodutiva, o que têm alterado substancialmente a classificação de todo o Reino Fungi. Nas filogenias mais recentes (Hibbett *et al.* 2007, Binder *et al.* 2013, Hibbett *et al.* 2014), os principais grupos de basidiomicetes macroscópicos encontram-se dentro do subfilo Agaricomycotina Doweld, o qual abrange três classes e inúmeras ordens e famílias. Os fungos com poros pertencem à classe Agaricomycetes Doweld, distribuindo-se polifileticamente em diversas ordens, sendo as mais importantes Hymenochaetales Oberw e Polyporales Gäum. A ordem Polyporales é a maior dentre as que incluem espécies de políporos, com 13 famílias e aproximadamente 216 gêneros e 1801 espécies (Kirk *et al.* 2008). Entretanto, muitos representantes dos políporos verdadeiros estão classificados dentro de Trechisporales K.H. Larss., Corticiales K.H. Larss., Gloeophyllales Thorn, Russulales Kreisel ex P.M. Kirk, P.F. Cannon & J.C. David e Agaricales Underw. Dentro da ordem Polyporales, são reconhecidos quatro clados principais incluindo espécies de políporos, Clado Poliporoide, Clado Antrodia, Clado Phlebioide e

Clado Poliporoide residual (Binder *et al.* 2013). No entanto, muitos subgrupos aparecem dentro dos clados e ainda não têm sua filogenia bem resolvida. Esses dados demonstram que a forma tubular do himenóforo é um caractere que evoluiu diversas vezes nos basidiomicetes, sendo um exemplo de convergência morfológica entre os diferentes grupos para o aumento da superfície formadora de esporos (Hibbett & Binder 2002). Devido à ocorrência de polifiletismo para muitos caracteres utilizados na taxonomia desses fungos, os sistemas de classificação não podem ser baseados em somente uma característica (Pegler 1996). Assim, a taxonomia moderna dos grupos de políporos envolve estudos filogenéticos e cladísticos, que levam em consideração a ontogenia, a morfologia e características biológicas e de cultivos (Pegler 1973, Ryvar den 1991, Hibbett & Binder 2002).

1.2. Morfologia

A análise morfológica, tanto macro quanto microscópica, forma uma das bases das principais classificações micológicas e é de fundamental importância para a taxonomia dos fungos, incluindo os políporos. O estudo macromorfológico dos políporos inclui análises da duração de vida, hábito, consistência e dimensões dos basidiomas, além do estudo das características do himenóforo e do píleo, quando presente. Quanto à longevidade, um basidioma pode ser anual, bianual ou perene, sendo que neste último novas camadas de tubos vão se desenvolvendo ao longo dos anos sobre as mais antigas. O hábito pode variar de ressupinado (totalmente aderido ao substrato) a pileado (formação de uma superfície superior, “chapéu”), ocorrendo diversas formas intermediárias. O hábito pileado pode ser efuso-reflexo, quando apresenta uma parte aderida ao substrato e outra não, séssil, quando há uma base que se insere diretamente no substrato, ou estipitado, quando há um estípite verdadeiro (pé) que se insere no píleo. Os fungos ressupinados geralmente são descritos com relação à forma da mancha no substrato (homogênea ou heterogênea, regular ou irregular, etc). Os fungos pileados podem apresentar grande variação na forma e nas características do píleo. A superfície superior destes varia quanto à coloração, presença de bandas e/ou cutícula e da rugosidade e textura, que vai de glabra até densamente pilosa. Além destas características, quando visto em corte longitudinal, o basidioma pode ser dividido em duas regiões: contexto (zona estéril) e tubos (himenóforo). O himenóforo pode apresentar grande variação, sobretudo quanto à coloração, forma e tamanho dos poros e tubos. A forma dos poros é muito variável, mesmo dentro de uma família ou gênero, podendo ser regulares (arredondados ou angulares), ou irregulares (alongados, sinuoso-dedalóides, lacerados transitando para

irpocóides ou até mesmo formas lameladas). As características do contexto, como coloração, consistência e estrutura (homogêneo ou com presença de diferentes camadas e de bandas ou linhas negras), também são importantes para a separação de algumas espécies ou gêneros. Nas espécies ressupinadas o contexto é geralmente chamado de subículo (Ryvarden & Johansen 1980). A variação da forma dos basidiomas está relacionada com duas estratégias de dispersão dos basidiósporos utilizadas por estes fungos. Na primeira, um basidioma efêmero é produzido, tendo um menor gasto energético, o que permite a produção de uma grande quantidade de esporos. Na segunda, é produzido um basidioma perene e resistente e toda vez que as condições do ambiente forem adequadas, esporos são produzidos (Ryvarden 1991).

O estudo da micromorfologia é de extrema importância na taxonomia dos políporos e consiste em mensurar e caracterizar suas estruturas microscópicas (Ryvarden 1991). As análises microscópicas se dão em todas as partes do basidioma, sendo as principais os tubos, formados pelo himênio (camada fértil formadora de esporos), a trama (região estéril que sustenta o himênio), e o contexto (região geralmente estéril, mas que pode formar estruturas de reprodução assexuada). A análise do sistema hifal, hoje uma característica indispensável para a taxonomia, consiste em verificar e classificar o fungo em relação aos tipos de hifas que compõem o basidioma e sua disposição no mesmo. As hifas generativas, ou hifas reprodutivas, estão presentes em todos os fungos e se caracterizam por apresentarem septos (simples ou com fíbulas) e geralmente possuem paredes finas. Além disso, elas são responsáveis por formar todas as estruturas presentes no basidioma. As demais hifas que podem estar presentes são estéreis (somáticas) e se caracterizam por não apresentarem septos e pelas paredes engrossadas. As hifas somáticas podem ser de dois tipos principais, esqueletais (esqueléticas) ou ligadoras (conectivas). As hifas esqueletais se caracterizam por serem geralmente retas, não apresentando ramificações ou pouco ramificadas, e com paredes muito espessas. As hifas ligadoras se caracterizam por possuírem muitas ramificações, paredes levemente engrossadas e calibre menor que as esqueletais. O sistema hifal pode ser classificado como monomítico, quando apresenta apenas hifas generativas, dimítico, quando apresenta dois tipos de hifas, ou trimítico, quando apresenta os três tipos de hifas. De acordo com Singer (1986), quando hifas generativas e esqueletais estão presentes, o sistema hifal denomina-se dimítico, e quando generativas e ligadoras estão presentes, anfimítico. Apesar de o sistema hifal ser tradicionalmente classificado nestes três tipos, muitas formas intermediárias de hifas podem ocorrer, como as hifas arboriformes, que possuem base reta e ápice ramificado, ou em alguns casos as hifas generativas podem apresentar paredes muito

engrossadas com septos esparsos, se assemelhando a hifas esqueléticas. Além disso, as diferentes partes dos basidiomas podem apresentar diferença no sistema hifal, como, por exemplo, o contexto monomítico e a trama dimítica. Por esse motivo, a análise e descrição das hifas presentes são de extrema importância para a separação de gêneros e espécies em políporos, sendo que alguns autores propõem uma classificação mais detalhada do sistema hifal (Zmitrovich *et al.* 2006). O himênio corresponde à camada fértil dos Basidiomycetes. Nos políporos, ele recobre as paredes internas dos tubos e é formado principalmente por basídios, basidiólos e cistidiólos, sendo os primeiros as principais células dessa região onde se formam os esporos sexuais (basidiósporos). Apesar de sua importância para a reprodução sexual, os basídios apresentam pouco valor taxonômico para a identificação de espécies e gêneros em políporos, sendo geralmente clavados, sem septos (tipo holobasídio) e com quatro esterigmas. Os basidiósporos são de extrema importância para a taxonomia dos políporos, podendo apresentar grande variação no tamanho e na forma. As paredes dos basidiósporos são geralmente lisas e finas, mas podem ser espessadas e/ou com ornamentações (verrugas, espinhos ou estrias), as quais podem ser inconspícuas ou facilmente visíveis. Diversos tipos de elementos estéreis com importância taxonômica podem ser encontrados no himênio ou na trama, e acredita-se que tenham função relacionada à retenção de umidade e defesa contra predadores. Dentre esses se destacam os cistídios, dendrohiáfídios e pedas (*hyphal pegs*). Os cistídios estão entre os principais elementos estéreis utilizados na separação de gêneros e podem ser bastante variáveis, apresentando paredes finas a muito engrossadas, e podem ou não ser incrustados com cristais. Esporos assexuais também podem ser encontrados em alguns políporos, sendo dois os tipos principais: conídios, que geralmente apresentam paredes finas e se desenvolvem a partir de ápices de hifas, e clamidósporos, que possuem paredes muito engrossadas e podem ter origem apical ou intercalar nas hifas (Gilbertson & Ryvarden 1986).

1.3. Características Biológicas

Apesar das técnicas moleculares serem de extrema importância para o estudo dos fungos em geral, outras características podem auxiliar na separação de gêneros em casos que a morfologia não oferece características suficientes para tal. Nobles (1958, 1965) foi uma das primeiras autoras a tentar compreender a biologia dos políporos e outros grupos de fungos com base em características biológicas e de cultura. Seus trabalhos foram de grande importância para o avanço do conhecimento dos fungos e, entre outros aspectos,

demonstraram a importância da polaridade sexual na biologia de cada espécie. Além de Nobles, outros autores utilizaram aspectos biológicos das espécies em seus estudos, como Stalpers (1978) e Nakasone (1990).

Os políporos, bem como os basidiomicetos em geral, podem apresentar diferentes sistemas de reprodução, que podem servir também como ferramentas taxonômicas no reconhecimento de gêneros ou espécies (Rajcehnberg 2011). As espécies homotálicas são aquelas que não apresentam um sistema de incompatibilidade, ocorrendo cruzamento sempre que dois micélios primários (originários da germinação de um esporo) se encontram. Já nas espécies heterotálicas, o cruzamento só ocorre quando dois micélios primários diferentes e compatíveis se encontram. O heterotalismo pode se apresentar de duas formas, bipolar ou tetrapolar. Nas espécies bipolares um espécime apresenta dois tipos de esporos (A1 e A2, sendo A o locus responsável pela reprodução), enquanto nas espécies tetrapolares quatro tipos de esporos ocorrem em um indivíduo (A1B1, A2B2, A1B2 e A2B1, sendo A e B os loci responsáveis pela reprodução) (Kües *et al.* 2011).

O estudo do comportamento nuclear em fungos superiores foi introduzido por Kühner (1945a, b, c; 1948), que demonstrou que os núcleos dos basídios, basidiósporos, esporos e micélios primário e secundário podem ser corados. Posteriormente, Boidin (1958) aplicou estas técnicas de coloração de núcleo no estudo de diversas espécies de fungos corticióides. O comportamento nuclear compreende o número de núcleos presentes em diferentes fases do ciclo de vida de um fungo (basidiósporos, micélio primário, micélio secundário) e variação do número de núcleos na presença/ausência de oxigênio. Segundo Boidin (1964, 1971), o comportamento nuclear pode ser classificado como:

1. Normal: Micélio primário com células uninucleadas; micélio secundário com células binucleadas.
2. Heterocítico: Micélio primário multinucleado; micélio secundário binucleado.
3. Astatocenocítico: Micélio primário multinucleado; micélio secundário binucleado e fibulado, tornando-se multinucleado com acúmulo de CO₂ e fíbulas sendo substituídas parcial ou totalmente por septos simples.
4. Holocenocítico: Micélio primário e secundário multinucleados.

Trabalhos acerca dos políporos utilizando dados de comportamento nuclear são escassos e em sua maioria foram realizados por Alix David, também em colaboração com outros autores. Em seus trabalhos, cujos dados foram posteriormente compilados em uma

única publicação (David 1988), a autora demonstrou a correspondência entre morfologia, características de cultura, comportamento nuclear e polaridade sexual em diversos gêneros de políporos e outros grupos de fungos. Dentre os trabalhos de David cabe destacar um especificamente sobre o gênero *Tyromyces sensu lato* (David 1980), onde a autora utiliza características biológicas e morfológicas para separar as espécies em diferentes gêneros.

Rajchenberg (2011) realizou uma revisão sobre a utilização do comportamento nuclear e da polaridade sexual de 68 gêneros de políporos, aliados aos resultados filogenéticos. Neste trabalho, o autor demonstra que, na maioria dos casos, cada gênero parece ter apenas um tipo de comportamento nuclear e de polaridade sexual. O mesmo foi evidenciado por Rajchenberg *et al.* (2011), que demonstraram que *Antrodia sensu lato* se divide em quatro gêneros diferentes em análises filogenéticas, e que cada um destes apresenta uma combinação distinta de comportamento nuclear e polaridade sexual. Com isso, gêneros que não podem ser claramente distinguidos pelas características morfológicas utilizadas tradicionalmente poderiam ser separados pelas diferentes características biológicas.

1.4. Importância Ecológica e Econômica

Os fungos que crescem sobre madeira, denominados xilófilos ou lignícolas, possuem um sistema enzimático capaz de transformar os elementos constituintes da madeira em nutrientes para seu crescimento (Tsujiyama & Minami, 2005). Os fungos que degradam celulose, hemicelulose e lignina são os causadores da podridão branca; já os que são incapazes de degradar lignina, consumindo somente a celulose e a hemicelulose, são os causadores da podridão castanha. Cerca de 94% dos Basidiomycetes são causadores de podridão branca, enquanto apenas 6% causam podridão castanha (Nakasone 1996). Enquanto os primeiros apresentam uma ampla distribuição, predominando em regiões tropicais, os últimos estão distribuídos principalmente em regiões temperadas (Ryvarden 1991), ocorrendo frequentemente relacionados com gimnospermas. Algumas espécies podem apresentar especificidade de hospedeiro, ou demonstrar preferências por madeira de árvores vivas ou mortas, tamanho do substrato, e estado de degradação da madeira, ocorrendo casos de espécies que colonizam somente substratos pré-degradados (Nakasone 1996). Os políporos têm grande importância ecológica devido à sua atividade como decompositores, constituindo um dos elos essenciais na ciclagem dos nutrientes (Rajchenberg 2006). Além disso, a madeira é um dos maiores componentes da biosfera, representando mais de 90% da biomassa em ecossistemas florestais, e ao mesmo tempo um substrato pouco utilizado como fonte de

energia, portanto a atuação das espécies lignícolas é de primordial importância na manutenção destes ecossistemas (Rayner 1995, Boddy *et al.* 2008). Estes fungos podem causar prejuízos econômicos ao atacarem madeira utilizada em construções e artefatos, além de poderem parasitar espécies arbóreas de valor econômico (Overholts, 1953). Por outro lado, diversas espécies de políporos têm suas enzimas exploradas do ponto de vista biotecnológico, sendo utilizadas principalmente na indústria têxtil, de celulose, de alimentos e de corantes e tintas. Também são largamente empregados em tratamentos de efluentes, biotransformação e biorremediação (Tsujiyama & Minami 2005).

1.5. Caracterização dos gêneros *Antrodiella*, *Flaviporus*, *Junghuhnia* e *Tyromyces*

Os gêneros *Antrodiella* Ryvardeen & I. Johans. (50 espécies), *Flaviporus* Murrill (13 espécies), *Junghuhnia* Corda (20 espécies) e *Tyromyces* P. Karst. (30 espécies) estão entre aqueles pertencentes à ordem Polyporales (Kirk *et al.* 2008). Caracterizam-se por serem causadores de podridão branca na madeira, presença de hifas generativas com fíbulas e de basidiósporos hialinos, sem ornamentações e geralmente pequenos. Enquanto *Antrodiella*, *Flaviporus* e *Junghuhnia* possuem sistema hifal dimítico (com presença de hifas generativas e esqueletais), *Tyromyces s.l.* apresenta sistema hifal monomítico. Cistídios de paredes grossas e densamente incrustados com cristais são característicos de *Junghuhnia*, mas também podem estar presentes em *Flaviporus*.

Apesar de, tradicionalmente, existirem diferenças morfológicas que separariam os gêneros, ocorrem diversos casos de sobreposição, e ainda não existe uma boa definição para cada um deles. Ao longo dos anos, diversas espécies foram recombinadas dentro desses gêneros, caso de *Flaviporus subundatus* [*Antrodiella subundata* (Murrill) Ryvardeen, *Junghuhnia subundata* (Murrill) Ryvardeen], *Flaviporus liebmanii* (Fr.) Ginns [*Antrodiella liebmanii* (Fr.) Ryvardeen], *Tyromyces duracinus* (Pat.) Murrill [*Antrodiella duracina* (Pat.) I. Lindblad & Ryvardeen], etc. Niemelä (1998) propôs a inclusão de todas as espécies de *Flaviporus* com esqueletocistídios em *Junghuhnia*, inclusive a espécie tipo do gênero, *Flaviporus brownii* (Humb.) Donk. Outro exemplo é o caso de *Tyromyces*, cuja espécie tipo, *T. chioneus* Fries, apresenta sistema hifal dimítico, no entanto o gênero é tradicionalmente definido como monomítico, e a grande maioria das espécies com esta característica e com hifas fibuladas vem sendo incluída neste (Ryvardeen & Gilbertson 1994). Isto demonstra que os caracteres morfológicos utilizados para delimitar os diferentes gêneros do grupo não são

claros, sendo interpretados de diferentes maneiras por diferentes autores, e que suas sinapomorfias ainda não estão bem estabelecidas.

1.6. Estudos no Brasil e no mundo

Os gêneros *Antrodiella*, *Flaviporus*, *Junghuhnia* e *Tyromyces* aparecem em praticamente todos os trabalhos relacionados a políporos, ocorrendo o registro de diversas espécies ao redor do mundo (Ryvarden & Johanson 1980; Gilbertson & Ryvarden 1986, 1987; Ryvarden & Gilbertson 1993, 1994; Nuñez & Ryvarden 2000, 2001). No Brasil, espécies são citadas em *checklists* e levantamentos em diversas regiões (Groposo & Loguercio-Leite 2005, Drechsler-Santos *et al.* 2008, Silveira *et al.* 2008, Baltazar & Gibertoni 2009, Baltazar *et al.* 2009, Gomes-Silva & Gibertoni 2009, Gugliotta *et al.* 2010, Westphalen *et al.* 2010, Abrahão *et al.* 2012, Borba-Silva *et al.* 2013), sendo que nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo, 29 espécies foram registradas (Tabela 1). No entanto, poucos trabalhos enfatizam este grupo de fungos e apenas alguns autores estudaram estes gêneros de forma específica. Lowe (1975) realizou um amplo estudo acerca do gênero *Tyromyces s.l.*, incluindo chaves de identificação e descrições de 48 espécies. Apesar de ter sido publicado há muitos anos, este trabalho ainda é o mais abrangente sobre *Tyromyces*, e muitas das espécies nele incluídas hoje já foram transferidas para outros gêneros. Ginns (1980) realizou estudo morfológico detalhado do gênero *Flaviporus*, propondo uma delimitação para este baseada principalmente em características micromorfológicas, como os esporos pequenos, as hifas que se aglutinam ao secar e, comumente, a presença de cistídios, embora possam estar ausentes em algumas espécies. Na China, diversos trabalhos vêm sendo publicados descrevendo novas espécies de *Antrodiella* e *Junghuhnia*, muitos deles incluindo dados moleculares, além dos morfológicos, e chaves de identificação (Yuan *et al.* 2006, 2012; Yuan & Dai 2008, 2009; Yuan 2012, 2013; Yuan & Qin 2012, Wan & Yuan 2013). Já Miettinen *et al.* (2006) estudaram o complexo de *Androdiella semisupina* no hemisfério norte, demonstrando que esta espécie não ocorre na Europa e que materiais identificados com este nome na verdade representam outras espécies relacionadas. No Brasil, Westphalen *et al.* (2012) realizaram uma revisão do gênero *Junghuhnia* para o país, onde das dez espécies previamente registradas a ocorrência de seis pôde ser confirmada. Neste trabalho, os autores apresentam descrições completas das espécies, além de ilustrações e uma chave de identificação.

Miettinen *et al.* (2012) realizaram estudo filogenético detalhado da família Steccherinaceae Parmasto, incluindo espécies de *Antrodiella*, *Flaviporus*, *Junghuhnia* e *Tyromyces*. Este é o trabalho mais importante realizado no grupo, onde foi demonstrado claramente o alto polifiletismo dos gêneros, sugerindo que as características morfológicas tradicionalmente usadas parecem ter pouca importância para a separação das espécies neste grupo de políporos. Um exemplo é o gênero *Junghuhnia*, cujas espécies estudadas se distribuem em quatro clados distintos, sendo que a maioria delas se agrupa com espécies de *Steccherinum* Gray, que apresenta himenóforo com dentes. Mais recentemente, Binder *et al.* (2013) realizaram um extenso estudo filogenético da ordem Polyporales. Neste trabalho os autores mostram que espécies dos gêneros *Antrodiella*, *Flaviporus* e *Junghuhnia* aparecem no “clado residual polyporoide”, relacionados à família Steccherinaceae, como já haviam demonstrado Miettinen *et al.* (2012). Já o gênero *Tyromyces* aparece em um clado específico (“clado *Tyromyces*”) mais relacionado ao “clado *Antrodia*”, que apresenta espécies de podridão marrom. Apesar de todos os gêneros terem se mostrado polifiléticos no trabalho de Miettinen *et al.* (2012), aparentemente *Tyromyces* é o que apresenta mais problemas em sua delimitação, tendo espécies espalhadas em diversos clados, o que pode ocorrer devido ao fato de que espécies com características muito distintas vêm sendo agrupadas neste gênero apenas pela presença de sistema hifal monomítico com hifas fibuladas.

Tabela 1. Lista de espécies de *Antrodiella*, *Flaviporus*, *Junghuhnia*, *Tyromyces* e relacionadas ocorrentes no sul do Brasil.

Espécie	RS	SC	PR	SP
<i>Antrodiella angulatopora</i> Ryvarden	X		X	X
<i>Antrodiella brasiliensis</i> Ryvarden & de Meijer			X	
<i>Antrodiella duracina</i> (Pat.) I. Lindblad & Ryvarden				X
<i>Antrodiella incrustans</i> (Berk. & M.A.Curtis) Ryvarden	X			
<i>Antrodiella luteocontexta</i> Ryvarden & de Meijer			X	
<i>Antrodiella multipileata</i> Log.-Leite & J.E. Wright	X	X		
<i>Antrodiella reflexa</i> Ryvarden & Núñez			X	
<i>Antrodiella semisupina</i> (Berk. & M.A. Curtis) Ryvarden	X	X	X	
<i>Antrodiella versicuttis</i> (Berk. & M.A. Curtis) Gilb. & Ryvarden	X			X
<i>Flabellophora obovata</i> (Jungh.) Corner	X	X	X	X
<i>Flaviporus brownii</i> (Humb.) Donk	X	X	X	
<i>Flaviporus hydrophilus</i> (Berk. & M.A. Curtis) Ginns		X	X	X
<i>Flaviporus liebmanii</i> (Fr.) Ginns	X	X	X	X
<i>Flaviporus subhydrophilus</i> (Speg.) Rajchenb. & J.E. Wright	X	X		
<i>Flaviporus subundatus</i> (Murrill) Ginns	X			X
<i>Flaviporus venustus</i> A. David & Rajchenb.	X		X	
<i>Junghuhnia carneola</i> (Bres.) Rajchenb.	X	X	X	X
<i>Junghuhnia meridionalis</i> (Rajchenb.) Rajchenb.	X	X	X	
<i>Junghuhnia minuta</i> I. Lindblad & Ryvarden	X	X	X	
<i>Junghuhnia nitida</i> (Pers.: Fr.) Ryvarden	X		X	X
<i>Junghuhnia polycystidifera</i> (Rick) Rajchenb.	X	X	X	X
<i>Junghuhnia undigera</i> (Berk. & M.A. Curtis) Ryvarden	X	X	X	X
<i>Tyromyces atroalbus</i> (Rick) Rajchenb.	X			
<i>Tyromyces crassisporus</i> C.L. Leite & J.E. Wright		X		
<i>Tyromyces fumideiceps</i> G.F. Atk.				X
<i>Tyromyces hypocitrinus</i> (Berk.) Ryvarden	X	X	X	
<i>Tyromyces leucomallus</i> (Berk. & M.A. Curtis) Murrill	X	X	X	X
<i>Tyromyces pulcherrimus</i> (Rodway) G. Cunn.	X		X	
<i>Tyromyces tephrus</i> (Pat.) Ryvarden		X		

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Ampliar o conhecimento taxonômico dos gêneros *Antrodiella*, *Flaviporus*, *Junghuhnia* e *Tyromyces* (Basidiomycota), fornecendo dados morfológicos, moleculares e biológicos das espécies que possam contribuir para sua sistemática e filogenia.

Objetivos específicos

- Conhecer as espécies de *Antrodiella*, *Flaviporus*, *Junghuhnia* e *Tyromyces* que ocorrem nos Estados de SP, PR, SC e RS;

- Obter informações morfológicas, biológicas e moleculares das espécies avaliadas para identificação de táxons e para uso em futuros estudos;

- Fornecer meios para identificação das espécies encontradas, através de chaves dicotômicas, descrições e ilustrações;

- Entender e elucidar as relações filogenéticas das espécies e gêneros estudados, confrontando os resultados das análises moleculares com as características morfológicas e biológicas;

- Realizar uma proposta taxonômica das espécies e gêneros estudados com base em suas características morfológicas, biológicas e filogenéticas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo

Este estudo foi realizado em quatro Estados do Brasil, compreendendo a Região Sul mais o estado de São Paulo, na Região Sudeste. A Região Sul do Brasil é composta pelos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, possuindo uma área de 576.409,6 km². Com relação ao clima, é a única região brasileira não incluída na zona tropical, apresentando variações sazonais nítidas, com possibilidade de geada e neve no inverno (Nimer 1989). Segundo a classificação de Köppen-Geiger, o clima é predominantemente subtropical úmido com verões quentes (Cfa) ou subtropical úmido com verões amenos (Cfb) em algumas áreas (Peel *et al.* 2007). Dentre os seis biomas terrestres do Brasil, dois predominam na Região Sul, a Mata Atlântica e o Pampa. O Rio Grande do Sul ocupa uma área de 281.748,538 km², da qual 66% correspondem a campos e 29% a florestas. O estado de Santa Catarina possui uma área de 96.000 km², e restam atualmente 17,5% das florestas originais, o que equivale à 1.662 ha. O Paraná possui área de 199.314,850 km², também formada principalmente por campos, os quais correspondem a 9% do território do Estado, e as florestas são principalmente florestas com Araucária, que inicialmente cobriam 44% de seu território, mas que vem sofrendo intensa exploração econômica e extração (IPARDES 2015). O Estado de São Paulo possui uma área de 248.222,362 km². O clima da região é variável e, segundo a classificação de Köppen-Geiger, pode ser de sete tipos diferentes, sendo predominantemente caracterizado pelo clima tropical de altitude, com chuvas no verão e seca no inverno (Cwa), sobretudo no centro do Estado. Em áreas litorâneas o clima é do tipo tropical superúmido (Af) (Setzer 1966). Dois biomas são encontrados na região, a Mata Atlântica e o Cerrado. O estado de São Paulo abriga parcela significativa da Mata Atlântica, compreendida em 2.670,324 ha de mata semicontínua, que ocorrem, principalmente, ao longo de seu litoral (SOS Mata Atlântica & Inpe 2011).

A Mata Atlântica inclui a floresta tropical latifoliada distribuída ao longo da costa brasileira desde o estado do Rio Grande do Sul até o estado do Rio Grande do Norte. Originalmente, abrangia uma área de 1.300.000 km², porém, devido à exploração de seus recursos, sobretudo devido à residência de 62% da população brasileira sobre a faixa litorânea (SOS Mata Atlântica, Inpe & ISA 1998), hoje sua área está reduzida a cerca de 7% da sua formação original, estando distribuída em pequenos fragmentos (Joly *et al.* 1991). A Mata Atlântica *sensu stricto* corresponde àquela classificada como Floresta Ombrófila Densa,

enquanto que a Mata Atlântica sensu lato inclui a Floresta Ombrófila Densa, as Florestas Estacionais Decidual e Semi-decidual e a Floresta Ombrófila Mista (Veloso *et al.* 1991, Leite 2002).

As principais fitofisionomias da Região Sul e do Estado de São Paulo visitadas neste trabalho foram:

- **Floresta Estacional Semidecidual:** Este tipo de floresta se caracteriza pela ocorrência de clima estacional, o que determina a semideciduidade da folhagem da cobertura florestal. Na zona subtropical, correlaciona-se ao clima sem período seco, com inverno frio (temperaturas médias mensais inferiores a 15° C), que determina repouso fisiológico e queda parcial da folhagem, enquanto que em zonas tropicais se caracteriza por uma estação seca e uma chuvosa (Veloso *et al.* 1991). A porcentagem das árvores caducifólias no conjunto florestal é de 20% a 50%. A vegetação é composta principalmente por macrofanerófitos que recobrem solos basálticos eutróficos. Esta floresta possui dominância de gêneros amazônicos de distribuição brasileira.

- **Floresta Ombrófila Densa:** Corresponde às formações florestais de Mata Atlântica *s.s.* Ocorre nas regiões da costa brasileira, tendo assim influência de massas de ar úmidas vindas do mar, sendo que as principais zonas conservadas se encontram na Serra Geral e Serra do Mar. Encontra-se distribuída ao longo de toda a costa litorânea brasileira, formando um mosaico constituído por manchas de várias idades e em diferentes estágios de sucessão, originadas por perturbações externas e processos de sucessão secundária (Vanini & Rodrigues 2003). A vegetação é caracterizada por fanerófitos - subformas de vida macro e mesofanerófitos, além de lianas, lenhosas e epífitas em abundância. O clima é tropical super-úmido, com temperaturas elevadas (médias de 25°C) e precipitação bem distribuída durante todo o ano (2.500 mm anuais), com concentração no período de dezembro a março (Armstrong & Conte 2010).

- **Floresta Ombrófila Mista:** Também conhecida como Mata com Araucária, é uma das formações vegetais mais ameaçadas do Brasil, com apenas 12,6% da sua extensão original (Ribeiro *et al.* 2009). Ocorre nos planaltos da formação Serra Geral, estendendo-se desde o norte do estado do Paraná, até o centro do estado do Rio Grande do Sul. A área de distribuição natural é o Planalto Meridional brasileiro. O termo “mista” é utilizado para caracterizar a presença de elementos tanto de origem tropical quanto temperada, em clima

subtropical sem estação de seca e com ocorrência de longo período frio (Veloso *et al.* 1991). A predominância na vegetação é de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze e ocorre em elevações acima de 800 m (Vibrans *et al.* 2011). Os remanescentes dessa floresta, muitos profundamente alterados, limitam-se a locais de difícil acesso, áreas particulares ou nas poucas Unidades de Conservação existentes.

3.2. Coleta de Material

As coletas foram realizadas em 27 diferentes áreas nos Estados de São Paulo, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul entre março de 2012 e março de 2014. Além destas, algumas coletas esporádicas foram realizadas após este período. As áreas visitadas são apresentadas na Tabela 2. Trilhas em diferentes remanescentes de mata foram percorridas, a fim de encontrar espécimes pertencentes ao grupo de interesse. Os basidiomas foram retirados do substrato com auxílio de uma faca e, posteriormente, acondicionados em sacos. Para cada espécime foi dado um número de coletor e foram feitas anotações sobre a data e local de coleta. Também evitou-se que os espécimes de uma coleta fossem acondicionados juntamente com os de outra, para que não houvesse mistura e conseqüente confusão na obtenção de culturas mono e polispóricas. Sempre que possível, os materiais foram fotografados em campo. Pequenos fragmentos dos espécimes de interesse foram colocados em tubos de microcentrifuga com sílica gel para posteriores análises moleculares.

3.3. Herborização do Material

Os espécimes coletados foram secos em desidratador portátil (aprox. 40 °C), em estufa com circulação de ar (40 – 50°C) ou ao ar livre. Em seguida, os materiais foram acondicionados em sacos de papel onde foram anotadas informações como o local e a data de coleta e número de coletor. Os espécimes identificados foram depositados na coleção do Herbário Maria Eneyda P. K. Fidalgo (SP) do Instituto de Botânica.

3.4. Análises Morfológicas

3.4.1. Análise macromorfológica

O estudo macromorfológico foi realizado a olho nú e com auxílio de microscópio estereoscópico, preferencialmente com basidiomas ainda frescos, e/ou com auxílio de

fotografias obtidas em campo. Este estudo incluiu análises do hábito (ressupinado ou pileado, esse último variando de efuso-reflexo a estipitado), consistência e dimensões dos basidiomas, além do estudo das características do himenóforo (cor, forma e tamanho dos poros, etc.) e do píleo (cor, presença de pelos e/ou zonas concêntricas, etc.), quando presente. Além destas, também foram observadas características do contexto em corte longitudinal, tais como coloração, consistência e presença de bandas.

Tabela 2. Áreas de Coleta

Estado	Município	Área de Coleta
PR	Curitiba	Parque Barigui
	Guaraqueçaba	APA Guaraqueçaba
	Matinhos/Paranaguá	Área prox. à rodovia PR 508
	Morretes	Serra da Graciosa
	Piraquara	Morro do Canal
RS	Caçapava do Sul	Pedra do Segredo
	Cambará do Sul	Parna da Serra Geral - Itaimbezinho
	Cambará do Sul	Parna da Serra Geral - Fortaleza
	Caxias do Sul	Terceira Léguas
	Dom Pedro de Alcântara	Mata da Cova Funda
	Morrinhos do Sul	Perdida
	Porto Alegre	Morro Santana
	São Francisco de Paula	CPCN Pró-Mata
São Francisco de Paula	FLONA SFP	
SC	Florianópolis	Morro da Lagoa
	Florianópolis	Unidade de Conservação Ambiental do Desterro
	Itapoá	RPPN Volta Velha
	Joinville	Vale do Peri
	Santo Amaro da Imperatriz	Parque Estadual da Serra do Tabuleiro
SP	Cananéia	Parque Estadual da Ilha do Cardoso
	Campos do Jordão	Parque Estadual de Campos do Jordão
	Peruíbe	Estação Ecológica Juréia-Itatins
	Ribeirão Grande	Parque Estadual Intervales
	Santo André	Reserva Biol. do Alto da Serra de Paranapiacaba
	São Luiz do Paraitinga	P.E. da Serra do Mar - Núcleo Sta. Virgínea
	São Paulo	P.E. da Cantareira
São Paulo	Parque Estadual Fontes do Ipiranga	

3.4.2. Análise micromorfológica

Para a análise microscópica, foram feitos cortes à mão livre dos tubos e do contexto utilizando uma lâmina de aço. Em seguida, esses cortes foram montados em lâminas para microscopia com solução aquosa de hidróxido de potássio 3% (hidratante) e floxina a 1% (corante citoplasmático) (Fig. 1a). Todas as microestruturas presentes, tais como hifas,

cistídios e esporos, foram medidas com auxílio de ocular micrometrada em aumento de 1000x. Também foi realizada uma análise detalhada do sistema hifal, observando separadamente as hifas presentes no contexto e nos tubos, já que em muitas espécies do grupo de estudo as hifas esqueléticas podem estar presentes somente em uma destas partes. Para a melhor observação do sistema hifal em algumas espécies que apresentam hifas muito aglutinadas, pedaços dos basidiomas foram colocados em frascos contendo hidróxido de sódio 5% e mantidos em estufa a 60°C por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, as hifas foram separadas com auxílio de agulhas histológicas sob microscópio estereoscópico e lâminas para microscopia foram montadas. Para a observação da presença/ausência de reação metacromática nas hifas foi utilizado o reagente azul de cresil (Fig. 1b). Quando necessário, o reagente de Melzer foi utilizado para verificar presença de reação amilóide ou dextrinóide. As estruturas microscópicas presentes foram desenhadas com auxílio de câmara clara acoplada ao microscópio.

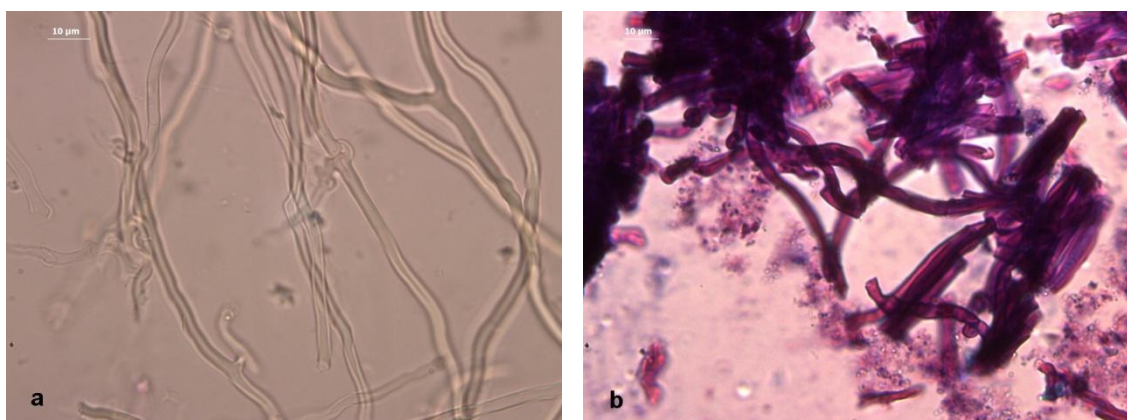


Fig 1. Hifas vistas sob microscópio em floxina e KOH (a) e com reação metacromática em azul de cresil (b)

3.5. Identificação do Material e Revisão de Herbários

Para a identificação foi utilizada a bibliografia pertinente com descrições macro e microscópicas e chaves de identificação. Alguns dos principais trabalhos consultados foram: Lowe (1975), Gilbertson & Ryvardeen (1986, 1987), Ginns (1980), Rajchenberg (1987, 2006), Ryvardeen & Johansen (1980), Silveira & Guerrero (1991), Westphalen *et al.* (2012) e Yuan *et al.* (2012). Para auxílio na identificação e comparação também foram estudados materiais de referência. Materiais tipo das espécies de interesse, bem como outras coleções que

pudessem auxiliar no reconhecimento das espécies ou que servissem como meio de comparação de caracteres morfológicos, foram solicitados a diversos herbários.

3.6. Obtenção de Culturas e Estudos Biológicos

3.6.1. Obtenção de esporadas

Para a obtenção das esporadas, basidiomas frescos, preferencialmente no mesmo dia da coleta, foram colocados em câmara úmida sobre lâminas estéreis. Após 12-24h foi verificada a presença de esporos depositados sob as lâminas (Fig. 2). Quando necessário, as lâminas foram visualizadas sob microscópio óptico para verificar a presença de esporos. As esporadas obtidas foram armazenadas em geladeira a aproximadamente 4°C.



Fig 2. Esporada sobre lâmina estéril

3.6.2. Obtenção de culturas polispóricas

Para a obtenção das culturas polispóricas, uma gota de água destilada estéril foi espalhada sobre a esporada e transferida para placas de Petri de 90 mm de diâmetro com meio de cultura Ágar Extrato de Malte (AEM) ou Ágar Batata Dextrose (ABD). O inóculo foi semeado sobre a superfície das placas com auxílio de uma alça de cobre. Posteriormente, as placas foram transferidas para câmaras incubadoras para B.O.D. a 25°C, onde foram mantidas pelo tempo necessário para que os esporos germinassem (Fig. 3a) e o micélio cobrisse toda a superfície da placa. Após o desenvolvimento do micélio, as placas foram armazenadas em geladeira a aproximadamente 4°C. Em alguns casos, pedaços dos basidiomas ainda frescos foram colocados diretamente em placas com meio de cultura para a obtenção dos cultivos (culturas de tecido). Em algumas espécies cuja germinação dos esporos não ocorreu, mesmo com inúmeras tentativas, após a inoculação dos esporos em meios Ágar Batata Dextrose, Ágar Água e Ágar Fubá, carvão ativado foi pulverizado sobre as placas, com a finalidade de auxiliar na remoção de substâncias inibitórias presentes no Ágar (Fries 1978).

3.6.3. *Obtenção de culturas monospóricas*

Para a obtenção de culturas monospóricas foram utilizados os mesmos procedimentos iniciais citados anteriormente, exceto na separação dos esporos. Neste caso, a esporada foi raspada da lâmina e suspensa em água destilada a fim de diluir a quantidade de esporos inoculados. Em seguida, com auxílio de uma alça de cobre, uma gota de inóculo foi espalhada sobre a placa de Petri contendo meios AEM ou ABD. Em alguns casos, uma pequena quantidade de água já contendo os esporos diluídos foi inoculada diretamente sobre o meio de cultura. Quando a esporada se apresentava muito tênue foi seguido o mesmo procedimento utilizado para as culturas polispóricas, sem diluição do inóculo. Assim que iniciada a germinação, os micélios em desenvolvimento, cada um originário de um único esporo, foram separados individualmente (Fig. 3b), com o auxílio de uma agulha, e transferidos cada um para uma placa de Petri com 60 mm de diâmetro com meio AEM ou ABD. Em seguida, estas placas foram colocadas em câmaras incubadoras para B.O.D. a 25°C para desenvolvimento do micélio e transferidos posteriormente para geladeira a 4°C. Sempre que possível, pelo menos 14 esporos foram inoculados para obtenção de culturas monospóricas.

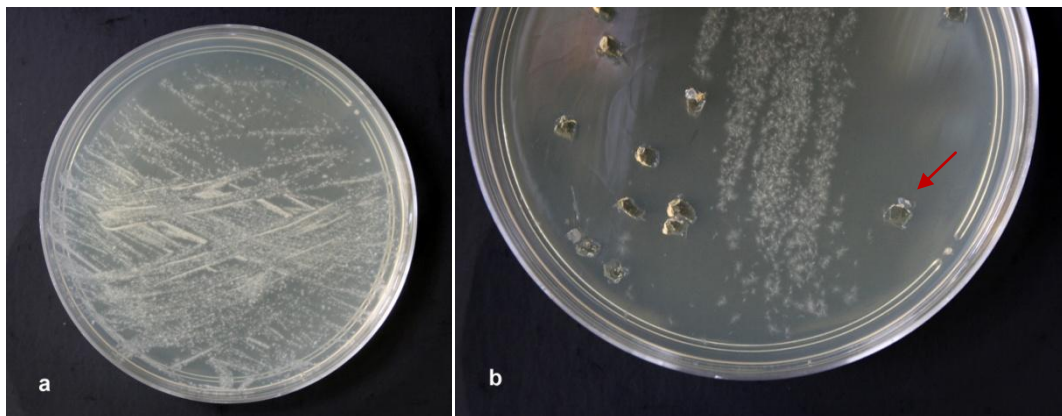


Fig 3a-b. Esporos após a germinação. a. Cultura polispórica. b. Separação dos esporos para obtenção de culturas monospóricas. Seta: área de onde cultura monospórica foi retirada.

3.6.4. *Determinação da polaridade sexual*

Para determinar os tipos de pareamento das culturas, foram realizados testes de compatibilidade, seguindo a metodologia de Hallenberg (1984), a qual consiste em confrontar, dois a dois, os cultivos monospóricos obtidos de cada espécime, em todas as combinações possíveis. Para esta técnica utilizou-se apenas espécies fibuladas e, sempre que possível, dez cultivos monospóricos de cada espécime foram pareados. Os inóculos foram

colocados no centro de uma placa de Petri de 60 mm de diâmetro com meio AEM ou ABD, a uma distância de aproximadamente 1 cm um do outro. As placas foram incubadas a 25°C, esperando o tempo necessário para que o crescimento fizesse com que os micélios entrassem em contato (Fig. 4). Em seguida, foi analisada, sob microscópio óptico, a zona de comunicação para verificar a presença ou ausência de fíbulas nas hifas, o que indica, respectivamente, compatibilidade ou incompatibilidade entre os cruzamentos.

Após a verificação de compatibilidade, foram elaboradas matrizes para a identificação das diferentes polaridades dos esporos e seus respectivos grupos pareamentos (“mating types”). As espécies foram classificadas como bipolares ou tetrapolares.

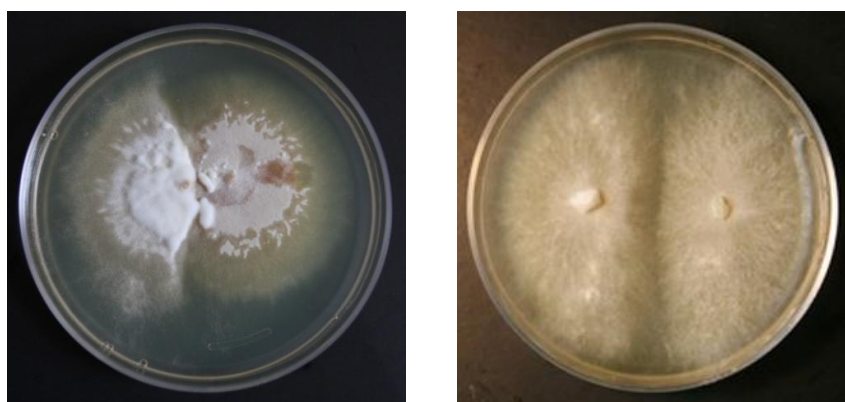


Fig 4. Cruzamentos entre culturas monospóricas.

3.6.5. Determinação do comportamento nuclear

O comportamento nuclear foi determinado a partir de cultivos de micélio primário (monospóricos) e secundário (polispóricos), de acordo com a metodologia de coloração empregada por Boidin (1958), utilizando solução de Giemsa. Inicialmente, um pequeno inóculo do micélio foi colocado em uma gota de meio Extrato de Malte líquido, sobre lâminas de microscópio estéreis. Para manter o crescimento do micélio aderido à lâmina, o inóculo foi coberto com uma membrana de nitrocelulose previamente preparada. Após o crescimento, uma solução saturada de Cl_2Hg foi aplicada sobre o micélio para fixar as células. Após 30 minutos, as amostras foram lavadas em água corrente por duas horas e posteriormente levadas em estufa para secagem. Os passos seguintes consistiram em remoção da membrana e preparação do micélio e são listados abaixo:

- 1) Remoção da membrana de nitrocelulose:
overnight em solução acetona: éter sulfúrico (1:1)
- 2) Re-hidratação:
10 min. em álcool absoluto
10 min. em em álcool 95%
10 min. em em álcool 70%
10 min. em em água destilada
- 3) Hidrólise:
10 min. em HCl 1N a 60°C (em estufa)
- 4) Lavagem:
5 min. em água destilada
- 5) Remoção de gorduras:
5 min. em álcool absoluto
20 min. eter
5 min. alcool absotulo
20 min. em água destilada
- 6) Coloração: Giemsa lento – aplicação de buffer fosfato e em seguida uma gota de geimsa por ml de H₂O neutra e deixar de 12 a 24 hs.

Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente a fim de retirar o excesso de corante, e secas em temperatura ambiente. O comportamento nuclear foi classificado como Normal, Heterocítico, Astatocenocítico ou Holocenocítico, de acordo com as definições de Boidin (1971).

3.7. Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada a partir das culturas obtidas, quando disponíveis, ou a partir de fragmentos de basidiomas. Todas as etapas das análises moleculares foram realizadas na Mendel University in Brno, na República Tcheca, durante estágio de pesquisa no exterior.

3.7.1. Extração de DNA de culturas

Para a extração de DNA a partir de culturas, o micélio fresco das amostras foi cultivado em placas de Petri de 60 mm em meio AEM. Após o crescimento, o micélio aéreo foi

cuidadosamente removido com auxílio de um bisturi, evitando recolher meio de cultura juntamente com as amostras. Os micélios foram então transferidos para tubos de microcentrífuga, previamente preparados, contendo uma esfera de aço estéril de 4 mm de diâmetro. Em seguida, os tubos foram mergulhados em nitrogênio líquido durante cerca de cinco segundos e então transferidos para um misturador vortex para rompimento das células com auxílio do rolamento de esferas de aço. Após estas etapas, a extração do DNA foi realizada utilizando *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN), de acordo com o protocolo.

3.7.2. Extração de DNA de basidiomas

Para a extração de DNA a partir de basidiomas, pequenos fragmentos, preferencialmente do contexto, foram removidos com auxílio de um bisturi e adicionados a tubos de microcentrífuga, cada um contendo uma esfera de aço estéril. Para o rompimento das células, o mesmo procedimento descrito para as culturas foi seguido. A extração de DNA foi realizada utilizando *Power Soil DNA Isolation Kit* (MO BIO), seguindo o protocolo. Para amostras mais antigas de herbários ou em casos em que a primeira tentativa de extração não foi bem sucedida, as amostras foram preparadas em tubos, tal como descrito anteriormente e, após o rompimento das células, os 10 primeiros passos do protocolo do *DNeasy Plant Mini Kit* foram seguidos. As amostras foram então enviadas ao departamento de Química e Bioquímica da Mendel University in Brno, onde a extração de DNA foi continuada utilizando tecnologia *magnetic-bead* (*MagNA Pure compact system*).

3.8. Amplificação de DNA

3.8.1. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Após a extração de DNA, as amostras foram preparadas para amplificação utilizando PCR *Touchdown*. Para cada reação, uma mistura foi preparada contendo água desionizada estéril, Mytaq DNA polymerase (Bioline) com tampão de PCR e *primers*. Aproximadamente 24 µl da mistura (contendo 17,5 µl de água, 0,5 µl de cada *primer* (50 mM), 6 µl de tampão e 0,15 µl de polimerase) foi pipetado em tubos de PCR e, em seguida, 1 µl da amostra foi adicionado a cada tubo. Os *primers* e o protocolo de PCR foram escolhidos de acordo com a região de DNA de interesse (Figura 5-8., Tabela 3). Para a região ITS-LSU (espaçador transcrito interno e subunidade ribossomal maior), foi realizado PCR touchdown com temperatura de anelamento gradualmente reduzida (60-50°C) (*primers*: ITS5/LR6). O mesmo regime de PCR (Rehner & Buckley 2005) foi utilizado para a amplificação da região EF1- α

(fator de alongação 1- α) (*primers*: 983F/2218R). As amplificações foram iniciadas com uma desnaturação a 94°C por 2 minutos. A temperatura de anelamento no primeiro ciclo de amplificação foi de 60°C, sendo subsequentemente reduzida 1°C a cada ciclo por nove ciclos. Após, 35 ciclos de amplificação adicionais foram realizados, cada um consistindo de 30s de desnaturação a 94°C, 30s de anelamento a 50°C e 1min de extensão a 72°C, concluindo com incubação a 72°C por 10 min.

Para a região RPB2 (segunda maior subunidade da RNA polimerase II), foi seguido protocolo de PCR touchdown de Justo (informação pessoal), modificado de Rehner & Buckley (2005). As amplificações foram iniciadas com uma desnaturação a 94°C por 2 minutos. A temperatura de anelamento no primeiro ciclo de amplificação foi de 60°C, sendo subsequentemente reduzida 1°C a cada ciclo pelos próximos oito ciclos. Após, 37 ciclos de amplificação adicionais foram realizados, cada um consistindo de 45s de desnaturação a 94°C, 90s de anelamento a 53°C e 2min de extensão a 72°C, concluindo com incubação a 72°C por 10 min. Em casos em que não houve sucesso na amplificação da região ITS-LSU, foram realizadas separadamente amplificações de ITS (*primers* ITS5/ITS4-Basidio) e/ou LSU (*primers* LR0R/LR6). Os regimes de PCR utilizados seguiram a metodologia de Tomšovský *et al.* (2010a).

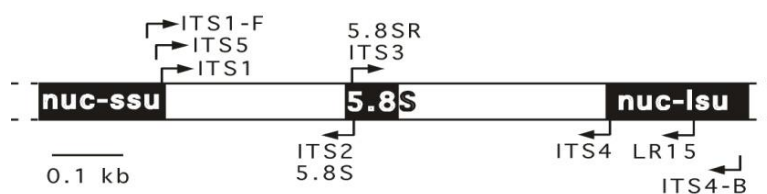


Fig 5. Região ITS: posição dos primers
(http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/protocols_folder/primers/primers.htm)

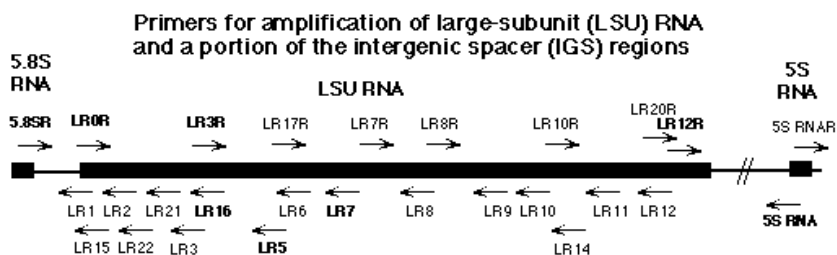


Fig 6. Região LSU: posição dos primers
(<http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>)

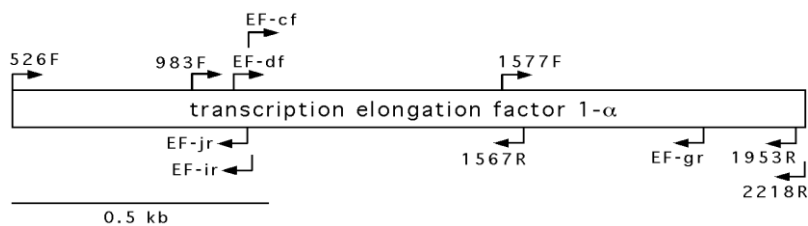


Fig 7. Região *EF-1α*: posição dos primers
(http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/protocols_folder/primers/primers.htm)

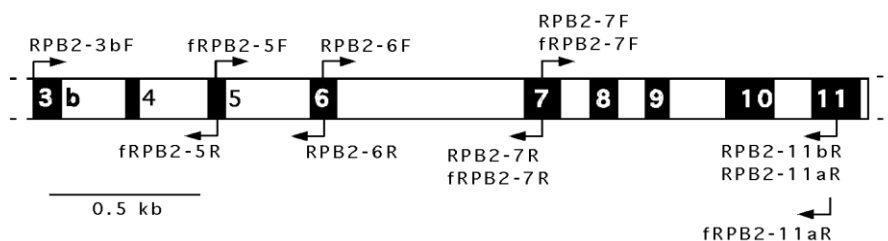


Fig 8. Região *RPB2*: posição dos primers
(http://a/www.clarku.edu/faculty/dhibbett/protocols_folder/primers/primers.htm)

3.8.2. "Nested" PCR

Em algumas amostras onde a PCR não apresentou bons resultados, foi realizada a metodologia de *nested* PCR de acordo com Tomšovský *et al.* (2010b). O mesmo protocolo descrito anteriormente foi seguido, utilizando o resultado da primeira PCR como amostra, ao invés do DNA genômico total (produto da extração). Os *primers* foram escolhidos de acordo com as regiões de interesse (Tabela 3).

Tabela 3. Primers utilizados.

Região DNA	Primers Touchdown PCR	Primers "Nested" PCR
ITS	ITS5, ITS4-Basidio	ITS1, ITS4
LSU	LR0R, LR6	NL1, NL4
<i>EF-1α</i>	983F, 2218R	EF595F, EF1160R
<i>RPB2</i>	fRPB25F, bRPB271R	—

3.8.3. Eletroforese

A eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR foi realizada a fim de verificar os tamanhos das bandas dos produtos. Para tal, 3µl de amostra e 2µl de corante (Gel Loading Dye 6×, NEB) foram adicionados a poços no gel de agarose e posteriormente submetidos a

uma corrente elétrica de 95 volts durante 45 minutos em uma Cuba de Eletroforese. As bandas foram verificadas sob luz UV e fotos foram tiradas com auxílio de uma câmara escura (Fig 9).

3.8.4 Purificação de DNA e Extração do Gel

Quando necessário, especialmente para o DNA extraído de basidiomas em que não se obteve bons resultados após a PCR, o DNA foi purificado utilizando DNA Clean & Concentration Kit (ZYMO RESEARCH), de acordo com o protocolo do fabricante. Após a purificação, as amostras de DNA foram utilizadas para uma PCR. Além disso, quando verificada a presença de bandas duplas nos produtos de PCR, uma nova eletroforese em gel de agarose foi realizada, a fim de separar as bandas e obter-se o produto de interesse. Para isso, 8µl de corante foram adicionados ao produto de PCR e, em seguida, submetidos a eletroforese sob uma corrente elétrica de 95 volts durante 60-70 minutos. Em seguida, a banda de interesse foi isolada com o auxílio de um bisturi e a extração de DNA a partir do gel foi realizada utilizando o kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). As amostras extraídas a partir do gel foram submetidas a uma nova eletroforese para verificar se a extração e a separação foram bem-sucedidas.

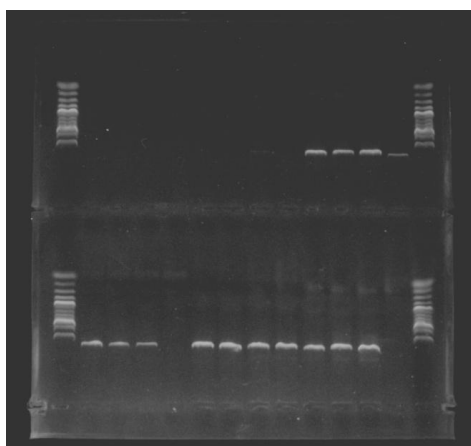


Fig 9. Eletroforese em gel de agarose (sob luz UV)

3.9. Sequenciamento do DNA

Todos os produtos de PCR que apresentaram resultados positivos foram enviados, juntamente com os *primers* pertinentes (Tabela 3), para sequenciamento na MacroGen

(Amsterdam). O sequenciamento foi solicitado com *primers* nas duas direções (*forward* e *reverse*) a fim de se obter as melhores sequências possíveis.

3.10. Análise dos dados

3.10.1. Alinhamento das sequências

Antes da preparação dos alinhamentos, todas as sequências foram verificadas no programa Chromas Lite 2.1, a fim de atestar a qualidade dos picos, e comparadas com sequências de outros espécimes da mesma espécie. Possíveis problemas encontrados, como a presença de bases ambíguas ou indicação de base faltando, foram corrigidos nos arquivos. Quando necessário, principalmente em caso de problemas nas extremidades das sequências, as sequências *forward* e *reverse* foram congregadas. Todas as sequências obtidas foram verificadas na base de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) usando a ferramenta BLAST. As sequências foram inicialmente editadas no software BioEdit (Hall 1999) e alinhadas utilizando o servidor online MAFFT e, quando necessário, ajustadas manualmente. Sequências de espécies de interesse disponíveis no GenBank foram adicionadas à base de dados.

3.10.2. Análises filogenéticas

O método de Máxima Verossimilhança (PhyML) foi aplicado para construir filogramas iniciais de todas as sequências obtidas, utilizando os serviços do servidor web em Phylogeny.fr (Dereeper *et al.* 2008). As sequências de interesse foram então selecionadas de acordo com os estudos específicos realizados e, após o alinhamento, o conjunto de dados foi utilizado para a construção das árvores filogenéticas com aplicação de inferência Bayesiana no software MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al.* 2012) e Máxima Verossimilhança no software PhyML (Guindon & Gascuel 2003). Os modelos evolutivos foram inferidos com o software jModelTest 2.c1.4 (Darriba *et al.* 2012). Os grupos externos foram selecionados de acordo com o conjunto de espécies utilizados em cada artigo redigido.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 124 espécimes do grupo de interesse foi estudado, correspondendo a 110 coletados durante as excursões a campo e 14 coletados por outros pesquisadores ou coleções de herbário. Além destes, materiais tipo e outras coleções de herbários foram analisados para comparação e confirmação das identificações. Com base nos estudos morfológicos, 24 espécies foram identificadas (Tabela 4). Os materiais de herbário examinados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 4. Espécies do grupo de interesse identificadas.

<i>Espécie</i>	<i>Estados de coleta</i>	<i>Nº de Espécimes</i>
<i>Antrodiella angulatopora</i>	SP	3
<i>Antrodiella duracina</i>	RS, SC, SP	6
<i>Antrodiella luteocontexta</i>	SP	3
<i>Antrodiella</i> aff. <i>semisupina</i>	RS, SC, SP	7
<i>Antrodiella</i> sp.	PR	1
<i>Aurantiopileus mayanensis</i>	RS, SP	2
<i>Flabellophora obovata</i>	RS, SC	7
<i>Flaviporus brownii</i>	RS, SC, PR, SP	14
<i>Flaviporus liebmannii</i>	RS, SC, PR, SP	19
Aff. <i>Flaviporus subhydrophilus</i>	RS, SP	5
<i>Flaviporus subundatus</i>	RS, PR, SP	8
<i>Flaviporus venustus</i>	RS, SP	4
<i>Junghuhnia carneola</i>	RS, SC, PR, SP	5
<i>Junghuhnia</i> aff. <i>carneola</i>	RS	2
<i>Junghuhnia minuta</i>	RS, SC, SP	6
<i>Junghuhnia</i> aff. <i>nitida</i>	RS, SP	3
<i>Junghuhnia polycystidifera</i>	RS, SC, SP	3
<i>Junghuhnia</i> cf. <i>semisupiniformis</i>	SP	1
<i>Junghuhnia undigera</i>	RS, SP	13
<i>Loweomyces</i> sp.1	RS	2
<i>Loweomyces</i> sp.2	PR	4
<i>Loweomyces</i> sp.3	RS	1
<i>Tyromyces atroalbus</i>	SP	4
<i>Tyromyces</i> aff. <i>fumidiceps</i>	SP	1

Tabela 5. Materias de herbário revisados.

Espécie	Material examinado
<i>Antrodiella angulatopora</i>	BRASIL: Rio Grande do Sul, São Salvador, J. Rick FR 20230, Jun.1943 (PACA holotype of <i>Ceriporopsis latemarginata</i>). VENEZUELA. Sucre: Trail between Manacal and Los Pocitos, NW. of Irapa, K. P. Dumont, R. F. Cain, G. J. Samuels, G. Morillo and J. Farfan VE6037, 13.Jul .1972 (NY holotype, O isotype). Aragua, Parque Nacional H. Pittier, L. Ryvardeen 40765, 25.Apr.1998 (O).
<i>Antrodiella brasiliensis</i>	BRASIL. Paraná: Campina Grande do Sul, Capivari, Parque Murambi, A.A.R. de Meijer 2248, 7.May.1992 (O); Colombo, Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira km 111, A.A.R. de Meijer & M.A.L. de A. Amazonas 3637, 28.May.1999 (O isotype).
<i>Antrodiella duracina</i>	GUADELOUPE, Grand-Etang, Capesterre, 1818 (FH, S type).
<i>Antrodiella incrustans</i>	BRAZIL: Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Morro Santana, 30/03/2007, M.C. Westphalen 021/07 (ICN 154075). USA: New England, Murray 5671 (K holotype).
<i>Antrodiella luteocontexta</i>	COSTA RICA: San José, Trurrubares, A. Ruiz-Bayer 992, 10.Dec.2014 (O). BRASIL: Paraná, Curitiba, Parque Barigui, A.A.R. de Meijer 2574, 5.Mar.1993 (O holotype).
<i>Antrodiella multipileata</i>	BRASIL: Santa Catarina, Florianópolis, Morro da Lagoa, Loguercio-Leite & Furlani 233, 26.Jul.1988 (FLOR holotype), Loguercio-Leite & Furlani 195, 26.Jul.1988 (FLOR paratype); Loguercio-Leite e Furlani 25, 27.Jul.1988 (FLOR paratype).
<i>Antrodiella murrillii</i>	COSTA RICA: San Jose, Canton de Dota, Zona Protectora Cerro Nara, A. Ruiz-Boyer <i>et al.</i> 443, 21.JUL.1998 (O).
<i>Antrodiella reflexa</i>	PUERTO RICO: Isabella, Quebradillas, near Parador Guajataca, L. Ryvardeen 39111, 27.Jun.1996 (O). PANAMA: Juncal, Coiba National Park, M. Nunez 130, 18.Nov.1996 (O holotype).
<i>Antrodiella semisupina</i>	USA: New England, unlocalized, C.J. Sprague 5860 (K holotype).
<i>Antrodiella versicutis</i>	CUBA: sine loc., C. Wright 137 (K lectotype), Wright 216 (S type).
<i>Flaviporus brownii</i>	GERMANY: Berlin, Garden. (NY type).
<i>Flaviporus hydrophilus</i>	CUBA: sine loc., C. Wright 350 (K holotype, NY type).
<i>Flaviporus liebmannii</i>	MEXICO: sine loc., F.M. Liebmann s.n. (NY merotype). Veracruz, Uxpanapa, near Campamento Hermanos Cedilla, A.L. Welden 3621, 14.Jul.1974 (NY). Estación Biológica de los Tuxtales entre Catemaco y Montepie, R. Vera 16, 25.Jul.1981 (NY).
<i>Flaviporus subundatus</i>	CUBA: Guantánamo, Baracoa, El Yunque Mountain; III.1903; L.M. Underwood & F.S. Earle 1168 (BPI US0243504 Holotype)

Tabela 5. Continuação.

Espécie	Material examinado
<i>Flabellophora obovata</i>	BRASIL: San Carlos, Amazon (NY type of <i>Polystictus stereoides</i> Sacc.).
<i>Hapalopilus nidulans</i>	SWEDEN: Halland, Fjaras, Rossared, Ingvar Nordin 10690, 12.XI.1988 (S F22785).
<i>Hapalopilus rutilans</i>	SWEDEN: Dalarna, Mora, Hemus, Nils Lundqvist 16936, 29.VIII.1987 (S F22797).
<i>Junghuhnia carneloa</i>	BRASIL: Santa Catarina, Blumenau, A. Moller s.n., 284, 465 (S syntypes).
<i>Junghuhnia crustacea</i>	INDONESIA: Java, Merapi (S type).
<i>Junghuhnia minuta</i>	ECUADOR: Orellana, Yasuni National park, Yasuni Scientific Research Station, L. Ryvardeen 44687, 9-12.Mar.2002 (O).
<i>Junghuhnia polycystidifera</i>	BRASIL: Santa Catarina, Blumenau, Parque Nacional da Serra do Itajaí, M.A.B Silva <i>et al.</i> 253, 12.Jun.2012 (FLOR). Rio Grande do Sul, S. Salvador, J. Rick FR 22630, 5.IV.1944 (PACA Holotype).
<i>Junghuhnia undigera</i>	CUBA: sine loc., C. Wright 457 (K holotype).
<i>Spongipellis caseosus</i>	BRASIL: São Paulo, Campinas, F. Woark, 1987 (FH type).
<i>Tyromyces tephrus</i>	ECUADOR: San Jorge, 1895 (FH, S types).
<i>Tyromyces atroalbus</i>	BRASIL: Rio Grande do Sul, Pouso Novo, J. Rick FR18397, 1932 (PACA lectotype). USA: Florida, Barnesville, W.A. Murril (NY holotype of <i>T. humeana</i>).
<i>Tyromyces fissilis</i>	SWEDEN: Södermanland, Hölö sn., Tullgarns slott, Slottsparken, K. Jaederfeldt <i>s.n.</i> , August 2005 (S). Västmanland, Norberg, Ängelsberg, Engelsbergs bruk, K. Jaederfeldt <i>s.n.</i> , 11 August 2007 (S). USA: North Carolina, <i>s.n.</i> , <i>s.d</i> (NY Type).
<i>Tyromyces fumidiceps</i>	USA: New York, Onondaga County, Bridgeport, J.L. Lowe 15903, 13.Sep.1979 (NY); Mississippi, Harrison Co., Tchoubouffa creek, A.L. Walden 4620, 4.Sep.1982 (NY).
<i>Tyromyces hypocitrinus</i>	BRASIL: Bahia, Challenger Expedition (K holotype).
<i>Tyromyces leucomallus</i>	CUBA: sine loc., C. Wright 104 (K holotype).
<i>Tyromyces pucherrimus</i>	TASMANIA: Wedge Bay, L. Rodway 1087, Apr 1917 (HO lectotype); <i>ibid.</i> , Gordon Wild Rivers National Park, P.K. Buchanan PKB 87/338, 17 May 1987 (PDD); vic. Hartz Mountains, Y. Abe, P.K. Buchanan PKB 87/374, 24 May 1987 (PDD); New Zealand: Craigieburn Forest Park, Lyndon Saddle Track, P.K. Buchanan, R.B. Alien, P.W. Clinton PKB 95/267, 14 November 1995 (PDD); Catilins River, P. Leonard, 07 January 2001 (PDD).

4.1. Polaridade Sexual e Comportamento Nuclear

Das 24 espécies estudadas, foram obtidas culturas polispóricas de 16 e monospóricas de dez. Os resultados dos estudos biológicos estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados das análises biológicas.

Espécie	Polaridade	Comportamento Nuclear
<i>Antrodiella angulatopora</i>	II	Astatocenocítico
<i>Antrodiella duracina</i>	IV	Normal
<i>Antrodiella</i> aff. <i>semisupina</i>	IV	Normal
<i>Antrodiella</i> sp.	IV	–
<i>Aurantiopileus mayanensis</i>	II	–
<i>Flaviporus liebmannii</i>	IV	–
Aff. <i>Flaviporus subhydrophilus</i>	IV	Normal
<i>Flaviporus venustus</i> *	II	Astatocenocítico
<i>Junghuhnia carneola</i> *	II	Astatocenocítico
<i>Junghunia nitida</i>	IV	Normal
<i>Junghuhnia undigera</i>	IV	Normal
<i>Tyromyces</i> aff. <i>fumidiceps</i>	IV	Heterocítico

II: bipolar

IV: tetrapolar

* resultados de David & Rajchenberg (1985)

Além das culturas listadas na Tabela 6, também foram obtidos cultivos polispóricos e monospóricos de *Loweomyces* sp.1 e *Loweomyces* sp.2 e polispóricos de *Junghuhnia polycystidifera*. Ambas as espécies de *Loweomyces* apresentaram um comportamento semelhante em cultivo. Após a germinação dos esporos, o crescimento do micélio continuou lentamente, formando uma crosta, onde poros começaram a se desenvolver. No entanto, após certo tempo (aprox. 2–3 semanas), o crescimento cessou e diversas tentativas de transferir o micélio para meios de cultura novos (Ágar de Extrato de Malte, Ágar Batata Dextrose e Ágar água) não obtiveram êxito, impedindo a realização de mais estudos. Esta pode ser uma característica biológica interessante do gênero e mais estudos são necessários para uma melhor compreensão do comportamento de espécies de *Loweomyces* em cultivo. Os cultivos polispóricos de *Junghuhnia polycystidifera* foram utilizados nas análises moleculares.

As espécies de *Flaviporus* também apresentaram problemas na obtenção e manutenção de cultivos. Apesar de *Flaviporus liebmannii* ter sido a espécie mais coletada neste estudo,

em apenas dois espécimes os esporos apresentaram germinação e em ambos os casos foi necessário o uso de carvão ativado sobre o meio de cultura para que a germinação ocorresse. Testes de pareamento foram realizados para as duas linhagens de *F. liebmannii*, no entanto, apenas uma delas apresentou resultados satisfatórios. Além disso, todos os cultivos monospóricos e polispóricos de *F. liebmannii* não apresentaram crescimento em consecutivas tentativas de transferência para meios de cultura novos, impedindo assim a realização de estudos de comportamento nuclear.

As matrizes obtidas nos testes de pareamento realizados neste estudo e os grupos de esporos encontrados em cada matriz são apresentados abaixo. Os números entre parênteses se referem às coleções estudadas.

Antrodiella angulatopora (RP 58)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		-	+	-	-	+	-	-	+	-
2			+	-	-	+	-	-	+	-
3				+	+	-	+	+	-	+
4					-	+	-	-	+	-
5						+	-	-	+	-
6							+	+	-	+
7								-	+	-
8									+	-
9										+
10										

A1: 1,2,4,5,7,8,10 A2: 3,6,9

Antrodiella angulatopora (RP 56)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		-	+	+	-	-	+	+	+
2			+	+	-	-	+	+	+
3				-	+	+	-	-	-
4					+	+	-	-	-
5						-	+	+	+
6							+	+	+
7								-	-
8									-
9									

A1: 1,2,5,6 A2: 3,4,7,8,9

Antrodiella duracina (410/12)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		-	-	+	-	-	-	+	-
2			-	-	+	-	+	-	-
3				+	-	-	-	+	-
4					-	-	-	-	+
5						+	-	-	-
6							+	-	-
7								-	-
8									+
9									

A1B1: 1,3,9 A2B2: 4,8 A1B2: 2,6 A2B1: 5,7

Antrodiella duracina (RP 96)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		-	+	-	+	-	-	+	+	+
2			-	-	-	-	-	-	-	-
3				-	-	-	-	-	-	-
4					-	-	-	-	-	-
5						-	-	-	-	-
6							-	-	-	-
7								-	-	-
8									-	-
9										-
10										

A1B1: 1 A2B2: 3,5,8,9,10 A1B2: 2,4,6,7 A2B1: ?

Antrodiella aff. semisupina (498/14)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	■	+	-	-	-	-	-	+	-	-
2	■	■	-	+	-	-	+	-	-	-
3	■	■	■	-	-	-	-	-	-	+
4	■	■	■	■	-	-	-	+	-	-
5	■	■	■	■	■	-	-	-	-	+
6	■	■	■	■	■	■	-	-	-	+
7	■	■	■	■	■	■	■	+	-	-
8	■	■	■	■	■	■	■	■	-	+
9	■	■	■	■	■	■	■	■	■	-
10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

A1B1: 1,4,7 A2B2: 2,8 A2B1: 3,5,6,9 A2B1: 10

Antrodiella aff. semisupina (369/12)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	■	-	+	-	-	-	-	+	-
2	■	■	-	-	-	+	-	-	+
3	■	■	■	-	+	-	+	-	-
4	■	■	■	■	-	+	-	-	+
5	■	■	■	■	■	-	-	+	-
6	■	■	■	■	■	■	-	-	-
7	■	■	■	■	■	■	■	+	-
8	■	■	■	■	■	■	■	■	-
9	■	■	■	■	■	■	■	■	■

A1B1: 1,5,7 A2B2: 3,8 A1B2: 2,4 A2B1: 6,9

Antrodiella sp. (469/13)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	■	+	-	+	-	-	-	+	-
2	■	■	-	-	-	-	-	-	-
3	■	■	■	-	-	-	+	-	+
4	■	■	■	■	-	-	-	-	-
5	■	■	■	■	■	-	+	-	+
6	■	■	■	■	■	■	+	-	+
7	■	■	■	■	■	■	■	-	-
8	■	■	■	■	■	■	■	■	-
9	■	■	■	■	■	■	■	■	■

A1B1: 1 A2B2: 2,4,8 A1B2: 3,5,6 A2B1: 7,9

Flaviporus liebmanii (413/12)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	■	+	-	-	-	-	+	-	+	-
2	■	■	-	+	-	-	-	-	-	+
3	■	■	■	-	+	-	-	-	-	-
4	■	■	■	■	-	-	+	-	+	-
5	■	■	■	■	■	+	-	+	-	-
6	■	■	■	■	■	■	-	-	-	-
7	■	■	■	■	■	■	■	-	-	+
8	■	■	■	■	■	■	■	■	-	-
9	■	■	■	■	■	■	■	■	■	+
10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

A1B1: 1,4,10 A2B2: 2,7,9 A1B2: 3,6,8 A2B1: 5

Aff. Flaviporus subhydrophilus (429/13)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	■	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2	■	■	-	-	-	+	-	-	-	-
3	■	■	■	-	-	-	+	-	-	-
4	■	■	■	■	-	-	+	-	-	-
5	■	■	■	■	■	+	-	-	-	-
6	■	■	■	■	■	■	-	+	-	+
7	■	■	■	■	■	■	■	-	+	-
8	■	■	■	■	■	■	■	■	-	-
9	■	■	■	■	■	■	■	■	■	-
10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

A1B1: 1,3,4,9 A2B2: 7 A1B2: 2,5,8,10 A2B1: 6

Aff. Flaviporus subhydrophilus (363/12)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	■	-	-	-	-	-	-	-
2	■	■	-	-	-	-	-	+
3	■	■	■	-	-	-	-	-
4	■	■	■	■	-	-	-	-
5	■	■	■	■	■	-	-	-
6	■	■	■	■	■	■	-	+
7	■	■	■	■	■	■	■	-
8	■	■	■	■	■	■	■	■

A1B1: 1,3,4,5,7 A2B2: ? A1B2: 2,6 A2B1: 8

Junghuhnia undigera (426/12)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		-	+	-	-	-	-	-	-
2			+	-	-	-	-	-	-
3				-	-	-	-	+	-
4					+	-	+	-	+
5						+	-	-	-
6							+	-	+
7								-	-
8									-
9									

A1B1: 1,2,8 A2B2: 3 A1B2: 4,6 A2B1: 5,7,9

Junghuhnia undigera (472/13)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		-	-	+	-	-	-	-	+
2			-	+	-	-	-	-	+
3				-	-	-	+	-	-
4					+	-	-	+	-
5						-	-	-	+
6							+	-	-
7								-	-
8									+
9									

A1B1: 1,2,5,8 A2B2: 4,9 A1B2: 3,6 A2B1: 7

Junghuhnia nitida (371/12)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		-	-	-	-	+	-	-	-	+
2			-	-	-	+	-	-	-	+
3				-	-	-	+	-	-	-
4					-	+	-	-	-	+
5						-	+	-	-	-
6							-	-	-	-
7								+	+	-
8									-	-
9										-
10										

A1B1: 1,2,4 A2B2: 6,10 A1B2: 3,5,8,9 A2B1: 7

Tyromyces aff. *fumidiceps* (404/12)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		-	-	+	-	+	-	+	-	+
2			-	+	-	+	-	+	-	+
3				+	-	+	-	+	-	+
4					-	-	-	-	+	-
5						-	+	-	-	-
6							-	-	+	-
7								-	-	-
8									+	-
9										+
10										

A1B1: 1,2,3,9 A2B2: 4,6,8,10 A1B2: 5 A2B1: 7

Aurantiopileus mayanensis (373/12)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		+	-	+	-	+	-	+	-	-
2			+	-	+	-	+	-	+	+
3				+	-	+	-	+	-	-
4					+	-	+	-	+	+
5						+	-	+	-	-
6							+	-	+	+
7								+	-	-
8									+	+
9										-
10										

A1: 1,3,5,7,9,10

A2: 2,4,6,8

4.2. Análises Moleculares

4.2.1. Extração e Amplificação do DNA

Um total de 102 espécimes foi submetido à extração e amplificação de DNA, resultando em 168 sequências obtidas. Entre estas, 29 foram adicionadas à base de dados através de colaboração com outros pesquisadores ou herbários, ou com material disponível na Mendel University in Brno, onde as análises moleculares foram realizadas em colaboração com o Dr. Michal Tomšovský. Dos 102 espécimes adicionados ao estudo, em 70 houve sucesso na amplificação de DNA pelo menos em uma região. No total, obtiveram-se as sequências de 35 espécies diferentes. Os resultados estão resumidos nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Espécimes utilizados nas análises moleculares e sequências obtidas.

Espécie	Espécime	Localidade	ITS	LSU	<i>tef1-a</i>	<i>rbp2</i>
<i>Antrodiella angulatopora</i>	RP 56	Brasil, SP	✓	✓		✓
<i>Antrodiella angulatopora</i>	RP 58	Brasil, SP	✓	✓	✓	✓
<i>Antrodiella angulatopora</i>	RP 110	Brasil, SP	✓	✓	✓	✓
<i>Antrodiella duracina</i>	RP 96	Brasil, SP	✓	✓		
<i>Antrodiella duracina</i>	MW 410	Brasil, SC	✓	✓	✓	
<i>Antrodiella luteocontexta</i>	RP 318	Brasil, SP	✓	✓		
<i>Antrodiella</i> aff. <i>semisupina</i>	MW 369	Brasil, RS	✓	✓	✓	✓
<i>Antrodiella</i> aff. <i>semisupina</i>	MW 389	Brasil, RS		✓		
<i>Antrodiella</i> aff. <i>semisupina</i>	MW 394	Brasil, RS	✓	✓	✓	
<i>Antrodiella</i> aff. <i>semisupina</i>	MW 497	Brasil, SP	✓	✓	✓	✓
<i>Antrodiella</i> aff. <i>semisupina</i>	MW 498	Brasil, SP	✓	✓		
<i>Antrodiella</i> sp.	MW 469	Brasil, PR	✓	✓	✓	
Cf. <i>Antrodiella</i>	MV 163	Brasil, SP	✓			
<i>Aurantiopileus mayanensis</i>	S 02	Brasil, SP			✓	
<i>Aurantiopileus mayanensis</i>	MW 373	Brasil, RS	✓	✓	✓	
<i>Aurantiporus</i> sp.	MW 420	Brasil, SP				
<i>Flabellophora obovata</i>	MW 348	Brasil, RS	✓	✓		
<i>Flabellophora obovata</i>	MW 408	Brasil, SC	✓	✓		
<i>Flabellophora obovata</i>	MW 416	Brasil, SC				
<i>Flaviporus brownii</i>	MW 362	Brasil, RS	✓	✓	✓	
<i>Flaviporus brownii</i>	MW 441	Brasil, RS	✓	✓		
<i>Flaviporus brownii</i>	MW 467	Brasil, PR				
<i>Flaviporus liebmannii</i>	MW 361	Brasil, RS				
<i>Flaviporus liebmannii</i>	MW 413	Brasil, SC				
<i>Flaviporus liebmannii</i>	MW 421	Brasil, SP				
<i>Flaviporus liebmannii</i>	MW 424	Brasil, SP				
<i>Flaviporus liebmannii</i>	MW 439	Brasil, RS	✓	✓		
<i>Flaviporus liebmannii</i>	MW 451	Brasil, SP	✓	✓		
Aff. <i>Flaviporus subhydrophilus</i>	MW 363	Brasil, RS	✓	✓	✓	
Aff. <i>Flaviporus subhydrophilus</i>	MW 378	Brasil, RS				

Tabela 7. Continuação. Espécimes utilizados nas análises moleculares e sequências obtidas.

Espécie	Espécime	Localidade	ITS	LSU	<i>tef1-a</i>	<i>rbp2</i>
<i>Aff.Flaviporus subhydrophilus</i>	MW 429	Brasil, RS	✓	✓	✓	✓
<i>Aff.Flaviporus subhydrophilus</i>	RP 191	Brasil, SP	✓	✓		
<i>Flaviporus subundatus</i>	MW 332	Brasil, SP	✓	✓		
<i>Flaviporus subundatus</i>	MW 367	Brasil, RS	✓			
<i>Flaviporus subundatus</i>	MW 445	Brasil, RS				
<i>Flaviporus subundatus</i>	MW 457	Brasil, PR	✓	✓		
<i>Flaviporus venustus</i>	MW 391	Brasil, RS	✓	✓	✓	
<i>Junghuhnia carneola</i>	MW 370	Brasil, RS	✓	✓	✓	
<i>Junghuhnia carneola</i>	MW 388	Brasil, RS	✓	✓	✓	✓
<i>Junghuhnia carneola</i>	MW 396	Brasil, RS	✓	✓	✓	✓
<i>Junghuhnia carneola</i>	MW 474	Brasil, SP	✓	✓	✓	
<i>Junghuhnia minuta</i>	MW 356	Brasil, SC	✓	✓		
<i>Junghuhnia minuta</i>	MW 386	Brasil, RS	✓	✓		
<i>Junghuhnia minuta</i>	MW 427	Brasil, RS				
<i>Junghuhnia minuta</i>	MW 430	Brasil, RS				
<i>Junghuhnia minuta</i>	MW 442	Brasil, RS	✓	✓		
<i>Junghuhnia nitida</i>	MW 371	Brasil, RS	✓	✓	✓	✓
<i>Junghuhnia nitida</i>	RP 79	Brasil, SP	✓	✓	✓	
<i>Junghuhnia polycystidifera</i>	MW 419	Brasil, RS	✓	✓	✓	
<i>Junghuhnia polycystidifera</i>	RP 140	Brasil, SP	✓	✓		
<i>Junghuhnia cf. polycystidifera</i>	MV 11	Brasil, SP		✓		
<i>Junghuhnia cf. semisupiniformis</i>	RP 62	Brasil, SP	✓			
<i>Junghuhnia undigera</i>	MW 426	Brasil, SP	✓	✓	✓	
<i>Junghuhnia undigera</i>	MW 472	Brasil, SP	✓	✓		
<i>Junghuhnia undigera</i>	MW 496	Brasil, SP.	✓	✓		
<i>Loweomyces</i> sp1.	MW 366	Brasil, RS	✓	✓		
<i>Loweomyces</i> sp1.	MW 382	Brasil, RS	✓	✓		
<i>Loweomyces</i> sp2.	MW 466	Brasil, PR				
<i>Loweomyces</i> sp2.	MW 468	Brasil, PR	✓	✓		
<i>Loweomyces</i> sp2.	MW 471	Brasil, PR	✓	✓		
<i>Loweomyces</i> sp2.	MW 488	Brasil, PR	✓	✓		
<i>Loweomyces</i> sp3.	MW 401	Brasil, RS	✓	✓		
<i>Rigidoporus cf. vinctus</i>	MW 181	Brasil, SP	✓	✓		
<i>Spongipellis</i> sp.	MW 440	Brasil, RS				
<i>Steccherinum aff. ochraceum</i>	MW 405	Brasil, SP	✓	✓		
<i>Tyromyces atroalbus</i>	MV 59	Brasil, SP				
<i>Tyromyces atroalbus</i>	MV 158	Brasil, SP	✓	✓	✓	
<i>Tyromyces atroalbus</i>	MV 266	Brasil, SP	✓	✓	✓	
<i>Tyromyces atroalbus</i>	MW 425	Brasil, SP	✓	✓		
<i>Tyromyces aff. fumidiceps</i>	MW 404	Brasil, SP	✓	✓		
<i>Tyromyces</i> sp.	RP 12	Brasil, SP	✓	✓		

Tabela 8. Sequências adicionais obtidas

Espécie	Espécime	Localidade	ITS	LSU	<i>tef1-α</i>	<i>rpb2</i>
<i>Antrodiella multipileata</i>	FLOR 10601	Brasil, SC				
<i>Antrodiella multipileata</i>	FLOR 10618	Brasil, SC				
<i>Antrodiella multipileata</i>	FLOR 10633	Brasil, SC				
<i>Antrodiella semisupina</i>	FLOR 31697	Brasil, SC				
<i>Antrodiella semisupina</i>	FLOR 10541	Brasil, SC				
<i>Bjerkandera adusta</i>	MT 49/2014	Czech Republic	✓	✓	✓	
<i>Bjerkandera adusta</i>	MT 48/2014	Argentina	✓	✓		
<i>Bjerkandera fumosa</i>	MT 51/13	Eslováquia	✓	✓		
<i>Flaviporus liebmannii</i>	F-500650	Burundi				
<i>Flaviporus liebmannii</i>	F-910196	Porto Rico				
<i>Flaviporus liebmannii</i>	F-910214	Porto Rico				
<i>Flaviporus liebmannii</i>	Kout 0610/B6	Belize				
<i>Junghuhnia meridionalis</i>	MR 284	Argentina	✓	✓	✓	✓
<i>Junghuhnia meridionalis</i>	MR 54	Argentina	✓	✓		
<i>Junghuhnia meridionalis</i>	MR 55	Argentina	✓	✓		
<i>Junghuhnia meridionalis</i>	ICN 154659	Brasil, RS				
<i>Junghuhnia meridionalis</i>	ICN 154660	Brasil, RS				
<i>Junghuhnia nitida</i>	MT 33/2012	Rep. Tcheca	✓	✓		
<i>Junghuhnia polycystidifera</i>	FLOR 49252	Brasil, SC		✓		
<i>Junghuhnia polycystidifera</i>	ICN 154122	Brasil, RS				
<i>Junghuhnia sp.</i>	ICN 154019	Brasil, RS				
<i>Loweomyces fractipes</i>	MT 13/2012	Eslováquia			✓	
<i>Tyromyces aff. atroalbus</i>	Kout 0610/A7	México	✓	✓	✓	
<i>Tyromyces aff. atroalbus</i>	Kout 0610/A10	México	✓	✓		
<i>Tyromyces aff. atroalbus</i>	Kout 0610/A13	México	✓	✓	✓	
<i>Tyromyces fumidiceps</i>	0709/191	EUA				
<i>Tyromyces fumidiceps</i>	0809/18	EUA				
<i>Tyromyces fumidiceps</i>	1009/13	EUA				
<i>Tyromyces fumidiceps</i>	1009/62	EUA	✓			

4.2.2. Análises filogenéticas

Os resultados das análises filogenéticas (Fig. 10) mostram que as espécies estudadas se distribuem polifileticamente em diversos gêneros, estando de acordo com os resultados de Miettinen *et al.* (2012). Os principais grupos encontrados dentro dos quatro gêneros estudados são detalhados a seguir.

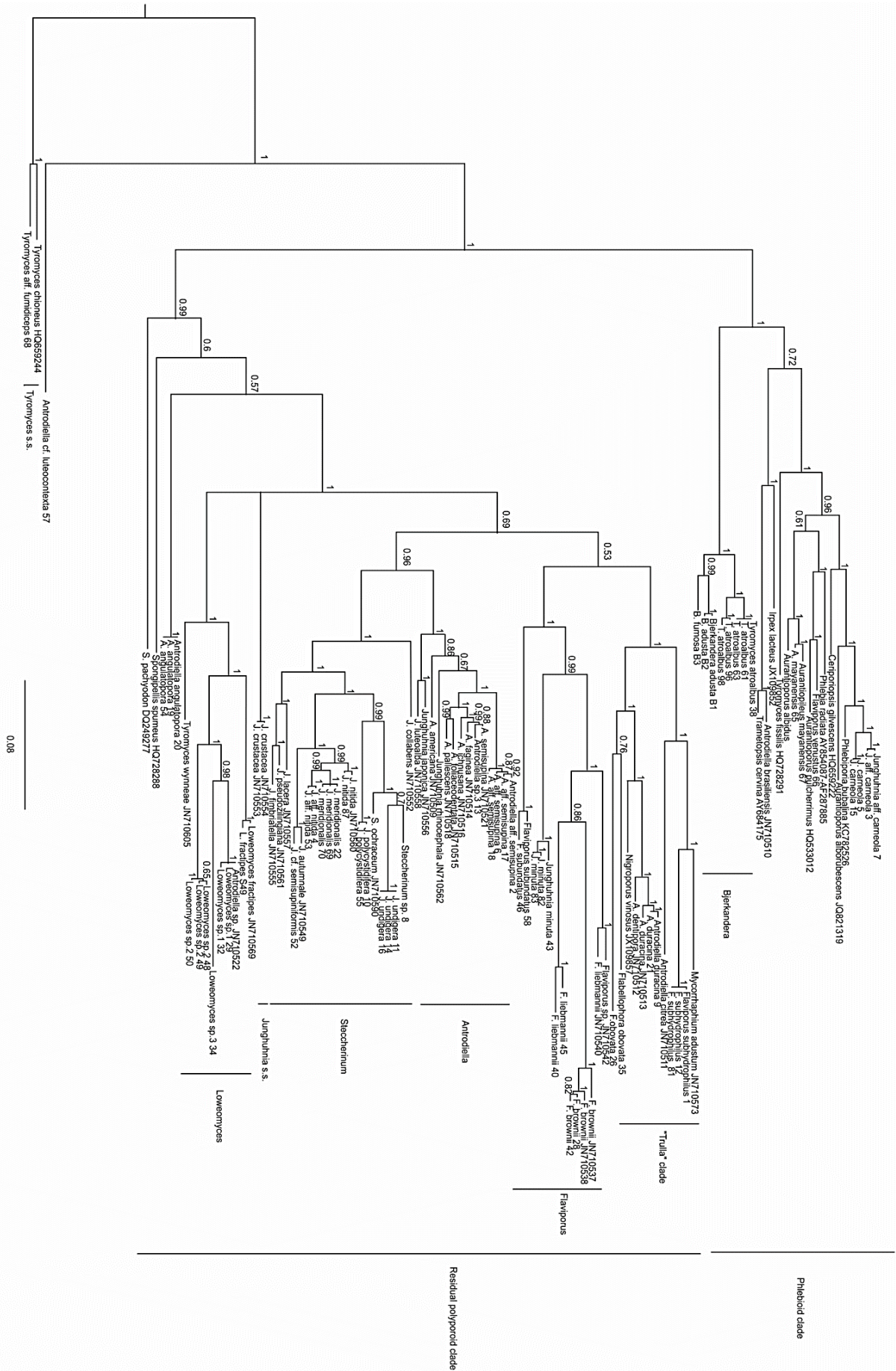


Fig 10. Árvore filogenética das regiões of ITS-LSU gerada por análise Bayesiana. Números nos ramos indicam os valores de probabilidade posterior (PP). Códigos se referem a sequências obtidas junto ao GenBank ou neste estudo

I. *Antrodiella* s.l.

- *Antrodiella* s.s.

Duas espécies parecem se encaixar no grupo de *Antrodiella* stricto sensu. *Antrodiella* sp. é filogeneticamente bastante próxima a *Antrodiella semimisupina* (Berk. & MA Curtis) Ryvar den (espécie tipo do gênero), mas morfológicamente se diferencia pela presença de esporos mais longos e cilíndricos. No entanto, apenas uma coleção desta espécie foi encontrada e mais materiais são necessários para confirmar sua posição taxonômica e identidade e, possivelmente, corroborar a descrição de uma nova espécie. *Antrodiella* aff. *semisupina* aparece mais distante das outras espécies do gênero nas árvores obtidas, mas está relacionada com *Antrodiella* s.s. e há evidências morfológicas e amostras suficientes disponíveis para a sua descrição como uma nova espécie de *Antrodiella*. Os dados obtidos deste grupo serão futuramente compilados e publicados (mais comentários em Considerações Finais).

- Clado *Loweomyces*

Os dados moleculares obtidos mostram a ocorrência de três espécies diferentes no clado *Loweomyces* Jülich (Berk & MA Curtis). Este gênero não foi anteriormente relatado no Brasil e a espécie tipo, *L. fractipes*, foi originalmente descrita para América do Norte. A ocorrência de três espécies não descritas pode mostrar que a diversidade deste gênero em regiões neotropicais é, na verdade, alta. Além disso, é possível que espécies deste grupo tenham sido confundidas com *Tyromyces* ou *Antrodiella*, devido à estrutura do sistema hifal e a presença de basidiósporos pequenos e subglobosos. *Loweomyces* sp.1 foi coletada no Rio Grande do Sul e as sequências obtidas são idênticas às fornecidas por Miettinen *et al.* (2012), obtidas a partir de um espécime coletado no Estado do Paraná. Já *Loweomyces* sp.2 foi coletada no Paraná e se caracteriza pela semelhança com espécies de *Antrodiella* s.s. Apenas um material da terceira espécie identificada (*Loweomyces* sp.3) está disponível neste grupo, e mais coleções são necessárias para esclarecer a sua posição taxonômica e descrição possível de uma nova espécie. Mais detalhes sobre as duas novas espécies de *Loweomyces* são apresentados no capítulo I.

- Clado *Trulla*/*Mycorrhaphium*

Este clado foi proposto por Miettinen *et al.* (2012) e compreende 4 gêneros: "Trulla" (gênero ainda não descrito oficialmente mas que incluiria *Antrodiella duracina* e outras

espécies relacionadas), *Flabellophora*, *Mycorrhaphium* e *Nigroporus*. Todas as espécies estudadas neste grupo apresentam contexto monomítico, com hifas fibuladas de paredes finas a engrossadas, e trama dimítica, com presença de hifas esqueléticas verdadeiras. *Flaviporus subhydrophilus* (Speg.) Rajchenb. & JE Wright foi descrita para a Argentina (Rajchenberg & Wright 1987) e posteriormente identificada em diferentes regiões do sul do Brasil (Silveira & Guerrero 1991, Guerber & Loguercio-Leite 1997). No entanto, análises do tipo mostraram que os materiais brasileiros são, na verdade, uma espécie distinta que apresenta contexto monomítico, característica ausente em *F. subhydrophilus*, que é totalmente dimítico. Apesar das semelhanças morfológicas com *A. duracina*, os materiais brasileiros identificados como *F. subhydrophilus* são filogeneticamente mais próximos a *Mycorrhaphium*, que apresenta himenóforo com dentes. Mais dados são necessários para esclarecer a posição taxonômica adequada para a espécie e, eventualmente, corroborar com a descrição de um novo gênero e/ou espécie. Os materiais estudados de *Flabellophora obovata* aparecem como duas linhagens diferentes nas análises moleculares, indicando na verdade que representam duas espécies distintas. Mais dados morfológicos e moleculares são necessários para esclarecer a relação entre estas e outras espécies do gênero e, possivelmente, corroborar com a descrição de uma nova espécie.

- *Antrodiella angulatopora*

Estudos dos tipos evidenciaram que esta espécie, originalmente descrita para a Venezuela, é na verdade um sinônimo de *Ceriporiopsis latemarginata* (Rick) Rajchenb., que foi descrita por Rick para Rio Grande do Sul (Rajchenberg 1987). Filogeneticamente esta espécie não se agrupa com nenhum dos outros gêneros encontrados e disponíveis na base de dados do GenBank. Apesar de ser bipolar e apresentar comportamento nuclear astatocenocítico, uma combinação característica do clado Phlebioide, *C. latemarginata* se agrupa no clado Residual Poliporoide (Binder *et al.* 2013). Além disso, morfológicamente, apresenta características distintas de outros gêneros de políporos, como o sistema hifal pseudo-dimítico com hifas fibuladas metacromáticas. As características moleculares, morfológicas e de cultivos corroboram, portanto, com a descrição de um novo gênero para esta espécie. Mais detalhes são apresentados no capítulo II.

- *Antrodiella brasiliensis*

Miettinen *et al.* (2012) apresentaram dados moleculares desta espécie, que se agrupa com *Trametopsis cervina* no clado Phlebioide. Estudos morfológicos foram realizados e esta

espécie será futuramente transferida para *Trametopsis*. Caracteriza-se pelos basidiomas brancos a creme, com poros irregulares e dentados, sistema hifal dimítico e esporos cilíndricos.

- *Antrodiella luteocontexta*

Esta espécie foi descrita para o Estado do Paraná (Ryvarden & Meijer 2002) e recentemente coletada em São Paulo (Pires & Gugliotta 2015). Caracteriza-se pela superfície do píleo e contexto amarelados, pelos poros grandes (2–3/mm) e pelos basidiósporos cilíndricos. Microscopicamente parece apresentar sistema hifal pseudo-dimítico, já que hifas fibuladas com paredes engrossadas podem ser observadas. Filogeneticamente, esta espécie apresenta uma posição isolada, portanto suas relações evolutivas ainda não são claras. Além disso, sequências das regiões ITS e LSU (rDNA) de apenas um espécime foram obtidas. Estudos filogenéticos mais detalhados, incluindo sequências de outras regiões e espécimes, bem como estudos de cultivos, podem auxiliar a resolver esta situação e encontrar a posição taxonômica adequada desta espécie.

II. *Flaviporus*

- *Flaviporus s.s.*

Diversos problemas foram encontrados ao se tentar obter sequências de diferentes espécies de *Flaviporus*. De 10 espécimes de *F. liebmannii* (Fr.) submetidos à extração de DNA, apenas dois foram bem sucedidos. Nas análises filogenéticas, *Junghuhnia minuta* se agrupa com outras espécies de *Flaviporus*, o que é suportado também por caracteres morfológicos (mais informações apresentadas no capítulo III). *Flaviporus subundatus* difere das outras espécies do grupo pela presença de hifas com septos simples, no entanto filogeneticamente este parece ser o gênero mais adequado para tratar esta espécie. Com a inclusão de *F. subundatus* e *J. minuta*, *Flaviporus* pode ser considerado monofilético. Morfológicamente, o gênero se caracteriza pelos basidiomas cartilagosos a cerosos que se contorcem ao secar, ficando muito duros e resinosos. Estas características podem também ser observadas na microscopia, já que as hifas são muito aglutinadas e extremamente difíceis de observar. Além disso, apresentam cístidios com formas variáveis, algumas vezes conspícuos e incrustados, outras vezes de paredes finas e muito difíceis de observar, e esporos muito pequenos, subglobosos a elipsóides. Os dados moleculares obtidos também demonstram que *F. liebmannii* é, na verdade, um complexo de espécies, o que também pode ser suportado por

diferenças encontradas nos basidióspoross. Materiais estudados do México, incluindo o tipo, apresentam esporos subcilíndricos ($3-3,5 \times 1,5-2 \mu\text{m}$), enquanto materiais brasileiros apresentam esporos elipsóides a subglobosos ($2,5-3,5 \times 2-2,5 \mu\text{m}$). Entretanto, formas intermediárias também podem ocorrer. Estudos morfológicos e moleculares adicionais, incluindo uma ampla amostragem, são necessários para resolver esta questão.

- *Flaviporus venustus*

Esta espécie difere morfológicamente das demais do gênero por apresentar sistema hifal claramente monomítico, hifas infladas e basidiomas grandes, quebradiços e com bandas concêntricas no contexto. Filogeneticamente, ocorre no clado Phlebioide, o que também é suportado pelas características de comportamento nuclear e polaridade (David & Rajchenberg 1985). As características morfológicas de *F. venustus* são bastante similares a *Aurantiporus*, no entanto a validade deste gênero é dúbia, já que a espécie tipo foi transferida para *Hapalopilus* P.Karst.

III. *Junghuhnia* s.l.

- Steccherinum clade

A maioria das espécies de *Junghuhnia* incluídas neste estudo se agrupam no clado *Steccherinum*. As relações evolutivas em *Steccherinum* ainda não são claras, já que este grupo de espécies poderia se dividir em diversos gêneros sem uma distinção morfológica clara (Miettinen *et al.* 2012). No momento, utiliza-se *Steccherinum* em um sentido amplo, mas se o gênero for dividido futuramente, as espécies brasileiras poderiam se agrupar em *Chaetoporus*, nome genérico disponível com *Junghuhnia nitida* como espécie tipo. A única exceção é *J. undigera*, que filogeneticamente aparece próxima a *Steccherinum ochraceum* (Pers. Ex JF Gmel.) Gray, espécie tipo do gênero, podendo ser, portanto, tratada como *Steccherinum* s.s. Além disso, os espécimes brasileiros identificados como *J. nitida* se distinguem morfológicamente e filogeneticamente de materiais europeus. Um espécime de *Junghuhnia* cf. *semisupiniformis* (Murrill) Ryvarden foi coletado no Estado de São Paulo. Esta espécie não havia sido registrada para o Brasil, mas coleções adicionais e dados moleculares e morfológicos são necessários para confirmar sua identificação.

- *Junghuhnia carneola*

Os materiais identificados como *Junghuhnia carneola* aparecem incluídos no clado Phlebioide e representam duas espécies distintas, mas bastante semelhantes morfológicamente. Caracterizam-se pelos basidiomas amarelados que se tornam avermelhados ao toque e/ou ao secar, e pela presença de cystídios longos, de parades finas a engrossadas, incrustados com pequenos cristais. As características morfológicas, juntamente com a posição filogenética das espécies, corroboram com a descrição de um novo gênero e uma nova espécie. Esta espécie apresenta sistema de reprodução bipolar e comportamento nuclear astatocenocítico (David & Rajchenberg 1985), combinação típica de espécies do clado Phlebioide. Os dados obtidos das espécies *Junghuhnia* s.l. são apresentados em detalhes no capítulo III.

IV. *Tyromyces*

- *Tyromyces* s.s.

Somente uma espécie coletada, identificada como *Tyromyces* aff. *fumidiceps*, faz parte de *Tyromyces* sensu stricto. Caracteriza-se pelas basidiomas carnosos quando frescos, com superfície do píleo acinzentada, pelo sistema hifal monomítico com hifas fibuladas e pelos esporos sublogobosos. No entanto, apenas um espécime foi encontrado e sua relação com *Tyromyces fumidiceps* ainda não é clara. Outros materiais identificados como *T. fumidiceps* disponíveis no herbário SP (SP307346, SP307424) apresentam características morfológicas distintas e não se encaixam no conceito da espécie. Esta espécie apresenta comportamento nuclear heterocítico, que também ocorre em outras espécies do gênero (David 1980). Mais coleções da espécie e a obtenção de sequências de materiais de *T. fumidiceps* da América do Norte são necessárias para resolver se os materiais brasileiros podem representar uma espécie nova ou espécimes neotropicais de *T. fumidiceps*.

- *Tyromyces atroalbus*

Esta espécie foi descrita por Rick (Rajchenberg 1987) e, apenas recentemente, novas coleções foram encontradas no Estado de São Paulo (Motato-Vasquez *et al.* 2014). Os dados moleculares obtidos mostram que *T. atroalbus* se agrupa com espécies de *Bjerkandera* P. Karst., o que também é suportado por dados morfológicos. Além disso, exemplares do México identificados como *T. atroalbus* foram adicionados a este estudo e apresentam diferenças nas sequências e em características morfológicas. Estes dados foram publicados no

artigo apresentado no Capítulo IV, onde uma nova combinação e uma nova espécie foram propostas.

- *Aurantiporus pulcherrimus* × *Aurantiopileus mayanensis*

Tyromyces pulcherrimus, descrita para a Tasmânia e Nova Zelândia, é mais comumente incluída em *Aurantiporus*, no entanto, como comentando anteriormente, a validade deste gênero ainda é incerta. Mais recentemente (Ginns *et al.* 2010), o gênero *Aurantiopileus*, com espécie tipo *A. mayanensis*, foi descrito para Belize, na América Central. Esta espécie apresenta morfologia praticamente idêntica à *A. pulcherrimus*, mas são filogeneticamente distintas. Os materiais brasileiros estudados se agrupam com *A. mayanensis*, demonstrando que esta espécie possui distribuição mais ampla na América tropical. Filogeneticamente, *Aurantiporus* se divide em dois grupos, um incluindo *Aurantiopileus mayanensis* e *Flaviporus venustus*, mais próximo à *Phlebia* s.s., e outro incluindo *Aurantiporus albidus*, *A. fissilis* e *A. pulcherrimus*. No entanto, não há suporte morfológico para separação destas espécies em gêneros distintos. No momento, os dados obtidos somente confirmam que as espécies do grupo não são relacionadas a *Tyromyces* s.s., porém mais estudos moleculares são necessários a fim de determinar qual o gênero adequado para tratá-las e sua relação com *Phlebia* s.s.

4.3. Táxons Excluídos ou com Posição Dúbia

Além das espécies citadas acima, os tipos de todas as demais espécies registradas para o Sul do Brasil foram estudados. No entanto, por falta de dados moleculares e morfológicos, não foram detalhados neste estudo. Comentários dos estudos de tipos são apresentados a seguir.

- *Antrodiella incrustans* (Berk. & M.A. Curtis ex Cooke) Ryvarden, Mycotaxon 20 (2): 344
Espécie caracterizada pelos basidiomas ressupinados, brancos a creme, macios e frágeis. Microscopicamente apresenta sistema hifal dimítico e basidiósporos elipsóides. Apesar de não terem sido encontrados esporos no material tipo, uma coleção estudada disponível no herbário ICN (154075) parece estar de acordo com o conceito da espécie. No entanto, ainda faltam dados para certificar que exemplares identificados com este nome no Brasil se tratam da mesma espécie que os materiais norte-americanos. Morfológicamente, *A. incrustans*

parece se encaixar no conceito de *Antrodiella* s.s., porém dados moleculares são necessários para verificar sua posição filogenética e confirmar qual o gênero adequado para tratá-la.

- *Antrodiella multipileata* C.L. Leite & J.E. Wright, Mycotaxon 41 (1): 167 (1991)

Espécie descrita para o Estado de Santa Catarina, caracterizada pelos basidiomas creme, efuso-reflexos, com poros um pouco irregulares e rompidos. Os tipos observados apresentam esporos muito colapsados, dificultando a medição. Além disso, hifas generativas de paredes muito engrossadas foram visualizadas, o que parece não se encaixar no conceito de *Antrodiella* s.s. Dados moleculares e novas coleções precisam ser observados para verificar o gênero mais adequado para esta espécie.

- *Antrodiella reflexa* Ryvardeen & Núñez, Mycotaxon 71: 362 (1999)

Espécie citada para o Estado do Paraná e que se caracteriza pelos basidiomas duros, superfície ocre a castanho pálida, formando uma cutícula avermelhada na base, poros muito pequenos (7–10/mm) e basidiósporos cilíndricos ($4-5 \times 3-3,5 \mu\text{m}$). Microscopicamente, o tipo apresenta hifas generativas muito colapsadas e somente as esqueléticas puderam ser observadas. Os basidiomas mais densos e a presença de cutícula em algumas partes da superfície do píleo distinguem essa espécie de outras de *Antrodiella*. Dados moleculares são necessários para verificar a posição filogenética da espécie e se este é o gênero adequado para tratá-la.

- *Antrodiella versicutis* (Berk. & M.A. Curtis) Gilb. & Ryvardeen, North American Polypores 1: 158 (1986)

Apenas esporos subglobosos foram encontrados no material tipo, enquanto a espécie é descrita com basidiósporos cilíndricos a alantoides. Além disso, basídios septados foram observados no material. É difícil determinar se os esporos e basídios visualizados são contaminações, ou se a espécie pertence a outro grupo de basidiomicetos e vem sendo identificada com um conceito incorreto. Caracteriza-se por possuir basidiomas muito duros, um pouco resinosos, com superfície do píleo castanha.

- *Flaviporus hydrophilus* (Berk. & M.A. Curtis) Ginns, Canadian Journal of Botany 58 (14): 1583 (1980)

Esta espécie foi citada para diferentes regiões no Sul do Brasil (Baltazar and Gibertoni 2009, Borba-Silva *et al.* 2013), no entanto, os materiais revisados depositados nos herbários SP (SP

211937) e FLOR (FLOR 42728, FLOR 51635) se assemelham mais a espécies do grupo *F. liebmannii*. *Flaviporus hydrophilus* se caracteriza pelos poros pequenos (9–12/mm), esporos elipsoides ($3,5\text{--}4 \times 2\text{--}2,5 \mu\text{m}$), superfície do píleo resinosa, formando uma crosta fina recoberta por pelos, e pelo contexto duplo, formado por uma linha negra acima dos tubos e uma região mais clara e menos densa entre a linha negra e a cutícula do píleo. *Flaviporus liebmannii* se diferencia pelos poros ligeiramente menores (10–15/mm), superfície do píleo glabra e pelo contexto homogêneo, denso, muito escurecido e resinoso quando seco. Mais espécimes coletados no norte e nordeste do Brasil precisam ser revisados para confirmar a ocorrência desta espécie no país ou determinar se os demais materiais também fazem parte do complexo *F. liebmannii*.

- *Tyromyces crassisporus* C.L. Leite & J.E. Wright, Mycotaxon 41 (1): 169 (1991)

Espécie descrita para o Estado de Santa Catarina, caracterizada pelos basidiomas pequenos, brancos a creme, pelo sistema hifal monomítico com presença de hifas incrustadas e pelos esporos de paredes grossas. As hifas incrustadas presentes se assemelham às de *Skeletocutis*, enquanto os esporos de paredes grossas (combinado com sistema hifal monomítico) são característicos de *Spongipellis*. Dados moleculares são necessários para verificar a verdadeira posição filogenética desta espécie, já que morfologicamente não se encaixa em nenhum dos conceitos dos gêneros utilizados.

- *Tyromyces hypocitrinus* (Berk.) Ryvarden, Mycotaxon 20 (2): 344 (1984)

Espécie macroscopicamente caracterizada pelos basidiomas macios com superfície do píleo amarelo-cítrica. Microscopicamente apresenta sistema hifal monomítico, gloecistídios e basidióspoross alantoides ($4\text{--}5 \times 1\text{--}1,5 \mu\text{m}$). A presença de gloecistídios é um indicativo de que *T. hypocitrinus* provavelmente não pertence à *Tyromyces* s.s., no entanto dados moleculares são necessários para resolver esta questão e verificar a posição taxonômica desta espécie.

- *Tyromyces leucomallus* (Berk. & M.A. Curtis) Murrill, North American Flora 9 (1): 36 (1907)

Esta espécie aparece em diversos trabalhos de políporos no Brasil, sendo comumente citada (Baltazar & Gibertoni 2009). No entanto, todos os materiais revisados apresentam hifas com paredes irregularmente engrossadas e metacromáticas, características do gênero *Postia*. O

mesmo tipo de hifa foi observado no material tipo de *T. leucomallus*, portanto esta espécie, na verdade, pertence a *Postia* e foi excluída deste estudo.

- *Tyromyces tephros* (Pat.) Ryvardeen, Occasional Papers of the Farlow Herbarium of Cryptogamic Botany 18: 35 (1983)

Os basidiomas ressupinados, castanho-claros, muito delicados e finos e a presença de sistema hifal monomítico e esporos elipsóides [$3,5-4,5(5) \times 2,5-3,5 \mu\text{m}$] relacionam esta espécie morfológicamente mais a *Ceriporiopsis* do que a *Tyromyces*. Apenas um material da espécie foi coletado no Brasil (FLOR 11884) e mais dados morfológicos e moleculares são necessários para identificar o gênero mais apropriado para esta espécie.

4.4. Artigos

A seguir são apresentados quatro capítulos referentes aos artigos publicados ou a serem publicados. Os artigos apresentados são:

Capítulo I. Morphological and phylogenetic studies on two new Neotropical species of *Loweomyces* (Polyporales, Basidiomycota).

Capítulo II. Extensive characterization of the new genus *Rickiopora* (Polyporales).

Capítulo III. Studies in Neotropical *Junghuhnia* s.l. (Polyporales, Basidiomycota): description of a new genus and two new species.

Capítulo IV. *Bjerkandera* in the Neotropics: phylogenetic and morphological relations of *Tyromyces atroalbus* and description of a new species.

Fotografias coloridas das espécies identificadas são apresentadas no **Anexo I**.

CAPÍTULO I

- Artigo a ser submetido para o periódico Mycological Progress -

Morphological and phylogenetic studies on two new Neotropical species of *Loweomyces* (Polyporales, Basidiomycota)

Mauro C. Westphalen¹ *, Michal Tomšovský², Mario Rajchenberg³ & Adriana M. Gugliotta¹

¹ Núcleo de Pesquisa em Micologia, Instituto de Botânica, Av. Miguel Estefano 3687, 04301-90, São Paulo, SP, Brazil. *Corresponding author: maurowestphalen@yahoo.com.br

² Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 3, CZ-61300, Czech Republic

³ Área de Protección Forestal, Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico, C.C. 14, 9200 Esquel, Chubut, Argentina.

Abstract

The genus *Loweomyces* is characterized by resupinate to stipitate basidiomes, mono-dimitic hyphal system with presence of pseudoskeletal hyphae, thin walled hymenial cystidia, and cyanophilous spore and hyphal walls. During a survey of polypores in Southern Brazil two unidentified species with similar features to *Loweomyces* spp. were found. Morphological and molecular studies were carried out in order to understand their morphological and evolutionary relationships and to confirm their phylogenetic and taxonomic placement. Sequences of the internal transcribed spacer and large subunit of ribosomal RNA were used for phylogenetic studies. *Loweomyces spissus* and *L. tomentosus* are proposed as new species. Full descriptions, illustrations and an identification key to the genus are presented.

Key words: Taxonomy, Phylogeny, xylophilous fungi, diversity

Introduction

Loweomyces, described by Kotlaba and Pouzar (1976) as a subgenus of *Spongipellis* Pat. and later raised to genus by Jülich (1982), is characterized by species with resupinate to stipitate basidiomes and a monomitic to dimitic hyphal system with presence of pseudoskeletal hyphae. It also presents thin walled hymenial cystidioid elements, which sometimes are rare and difficult to observe, and cyanophilous spore and hyphae walls. There are four names associated to *Loweomyces* in MycoBank databases, i.e. *L. fractipes* (Berk. & M.A. Curtis) Jülich (Jülich 1982), *L. sibiricus* (Penzina & Ryvarden) Spirin (Zmitrovich et al. 2006), *L. subgiganteus* (Berk. & M.A. Curtis) Spirin (Zmitrovich et al. 2006) and *L. wynneae* (Berk. & Broome) Jülich (Jülich 1982). However, only *L. fractipes* and *L. wynneae* had their

taxonomic positions confirmed by molecular data, being placed in the residual polyporoid clade (Miettinen et al. 2012, Binder et al. 2013). *Loweomyces fractipes*, the generic type species, is characterized by white, soft, usually stipitate basidiomes, monomitic hyphal system with presence of thick walled hyphae in the stipe and context and broadly ellipsoid to subglobose, $4.5\text{--}6 \times 4\text{--}5 \mu\text{m}$, basidiospores (Ryvarden & Gilbertson 1993). *Loweomyces wynneae* differs in smaller, ovoid to subglobose, $3\text{--}3.5 \times 2.5\text{--}3 \mu\text{m}$, basidiospores and abundant presence of thick-walled hyphae, but occasional clamps can be observed in thick walled hyphae, in transitions between generative and skeletal hyphae (Bernnichia 2005, Ryvarden and Gilbertson 1993). Both species were also treated in the genus *Abortiporus* Murrill in the past (Rauschert 1988, Gilbertson & Ryvarden 1986). However, its type species *A. biennis* presents a distinct monomitic hyphal system and gloecystidia, and molecular data revealed that it is not related to *L. wynneae* and *L. fractipes* (Miettinen et al. 2012). *Tyromyces* P. Karst. presents similar morphological characteristics to *Loweomyces*, but differs in absence of cystidia, non cyanophilous hyphae and spores, and also is characterized by distinctly monomitic species, with exception of *T. chioneus* (Fr.) P. Karst., which present skeletal hyphae. *Spongipellis* is another genus characterized by cyanophilous reaction of spores, but it presents a monomitic hyphal system without distinctly thick-walled hyphae, larger basidia and thick-walled basidiospores.

In a recent survey of polypores from southern Brazil, two unidentified species were collected and studied. Morphological and molecular data obtained indicate their relation with *L. fractipes* and *L. wynneae*; therefore, two new species in the genus are proposed. Full descriptions, images, illustrations and an identification key are presented.

Material and Methods

Specimens were collected in Southern Brazil in areas of Araucaria Forest in Paraná and Rio Grande do Sul States. The Araucaria Forest is characterized by subtropical vegetation with the dominance of the coniferous tree *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. Additional specimens of *Loweomyces* group from O herbarium, including a Brazilian specimen previously sequenced by Miettinen et al. (2012, as *Antrodiella* sp.), were studied for morphological comparison. For micromorphology studies, hand-cut sections of the basidiomes were prepared on microscope slides with 3% KOH solution. To observe hyphae separately and interpret the hyphal system, small pieces of the basidiomes were kept in NaOH 3% solution under 60 °C for about 12h. The samples were then used for preparing

microscope slides. Aqueous phloxine solution (1%) was used for staining. All microscopic structures observed were measured with aid of an eyepiece micrometer. Whenever possible, a minimum of twenty measurements were taken from each structure present. Drawings of the microstructures were made with the aid of a drawing tube under microscope (1000× magnification). For DNA extraction, DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) and magnetic-bead technology of MagNA Pure compact system (Roche) were used. When needed, DNA was purified using DNA Clean & Concentration Kit (Zymo Research). DNA amplification of the regions ITS and LSU were performed using ITS5/ITS4-Basidio (Nikolcheva and Bärlocher 2004) primer combination for ITS and LR0R/LR6 (Moncalvo et al. 2010) for LSU. The PCR regimes followed Tomšovský et al. (2010a). In samples where PCR did not yield satisfactory results, a nested PCR was performed following Tomšovský et al. (2010b).

Amplified products were sent for custom purification and sequencing to MacroGen Ltd. (Korea). The sequences obtained were initially edited in BioEdit (Hall 1999) and adjusted manually when needed. Reference sequences were chosen based on Miettinen et al. (2012), Tomšovský and Jankovský (2008), and through BLAST searches in the NCBI database (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequences selected for this study are summarized in Table 1. The dataset of sequences was aligned using MAFFT online server (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) and used for the construction of phylogenetic trees applying Bayesian inference in the software MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al. 2012) and Maximum Likelihood in PhyML (Guindon & Gascuel 2003). The Bayesian analyses were run for 5 million generations, sampling every 500 generations. Burnin was set to 10% of the trees. For Maximum Likelihood, 1000 replicates were used for bootstrap calculation. The evolutionary models were inferred with the jModelTest 2.c1.4 (Darriba et al. 2012) using AIC criterion. The best fit model selected was TIM2+I+G.

Table 1. List of sequences used in this study. *Sequences obtained in this study.

Specimen	GenBank No.	
	ITS	LSU
<i>Abortiporus biennis</i>	KP135300	KP135300
<i>Antrodia heteromorpha</i>	KC543145	KC543145
<i>Antrodiella americana</i>	JN710509	JN710509
<i>Antrodiella dentipora</i>	JN710512	JN710512
<i>Antrodiella duracina</i>	JN710513	JN710513
<i>Antrodiella faginea</i>	JN710514	JN710514
<i>Antrodiella semisupina</i>	JN710521	JN710521
<i>Antrodiella romellii</i>	JN710520	JN710520

<i>Antrodiella palescens</i>	JN710518	JN710518
<i>Antrodiella</i> sp.	JN710522	JN710522
<i>Aurantiporus alborubescens</i>	JQ821319	JQ821318
<i>Aurantiporus fissilis</i>	HQ728292	HQ729002
<i>Bjerkandera adusta</i>	KT305935	KT305935
<i>Bjerkandera fumosa</i>	KT305937	KT305937
<i>Ceriporiopsis gilvescens</i>	HQ659222	HQ659222
<i>Cymatoderma dendriticum</i>	JN649339	JN649339
<i>Flaviporus brownii</i>	JN710537	JN710537
<i>Flaviporus brownii</i>	JN710538	JN710538
<i>Flaviporus liebmanii</i>	JN710540	JN710540
<i>Flaviporus liebmanii</i>	JN710542	JN710542
<i>Irpex lacteus</i>	JX109852	JX109852
<i>Junghuhnia atumnale</i>	JN710549	JN710549
<i>Junghuhnia crustacea</i>	JN710554	JN710554
<i>Junghuhnia nitida</i>	JN710560	JN710560
<i>Laetiporus sulphureus</i>	EU840565	EU884420
<i>Loweomyces fractipes</i>	KP859304	KP859309
<i>Loweomyces fractipes</i>	JN710568	JN710568
<i>Loweomyces fractipes</i>	JN710569	JN710569
<i>Loweomyces fractipes</i>	JN710570	JN710570
<i>Loweomyces fractipes</i> *	S49	
<i>Loweomyces spissus</i> *	48	
<i>Loweomyces spissus</i> *	49	
<i>Loweomyces spissus</i> *	50	
<i>Loweomyces tomentosus</i> *	29	
<i>Loweomyces tomentosus</i> *	32	
<i>Loweomyces wynneae</i>	JN710604	JN710604
<i>Loweomyces wynneae</i>	JN710605	JN710605
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	HQ188436	GQ470643
<i>Phanerochaete sordida</i>	EU118653	EU118653
<i>Phlebia radiata</i>	AY854087	AF287885
<i>Podoscypha multizonata</i>	JN649360	JN649360
<i>Skeletocutis nivea</i>	JX109858	JX109858
<i>Spongipellis spumenus</i>	HQ728285	HQ729017
<i>Spongipellis spumenus</i>	HQ728287	HQ729021
<i>Steccherinum bourdotii</i>	JN710584	JN710584
<i>Steccherinum ochraceum</i>	JN710590	JN710590
<i>Steccherinum tenuispinum</i>	KM411452	KM411452
<i>Trametopsis cervina</i>	AY684175	AY855907
<i>Tyromyces polyporoides</i>	JN710602	JN710602
<i>Tyromyces chioneus</i>	HQ659244	HQ659244

Results

Our phylogenetic analysis shows that *Loweomyces* is well supported in the residual polyporoid clade, related to the group of *Antrodiella*, *Flaviporus* and *Steccherinum* genera, but separated from those. The morphological and molecular data obtained sustain the description of two new species in *Loweomyces* (Fig. 1). *Loweomyces tomentosus* is characterized by the soft basidiomes with a distinct tomentum layer composed by loose hyphae. *Loweomyces spissus* presents harder, tough to sub-woody basidiomes and lacks a distinct tomentum layer. The hyphal system in both species is difficult to interpret, presenting many branched to non-branched thick-walled hyphae with sparse clamps. Morphological analysis of herbarium specimens show that *L. fractipes* is distinguished by a more distinct monomitic hyphal system, while the new species have a dimitic structure (or seemingly dimitic) very similar to *L. wynneae* (see Discussion for more comments). Morphological and molecular analysis also showed that the specimen studied previously identified as *Antrodiella* sp. and sequenced by Miettinen et al. (2012) is identical to the specimens of *L. tomentosus* collected in Rio Grande do Sul State.

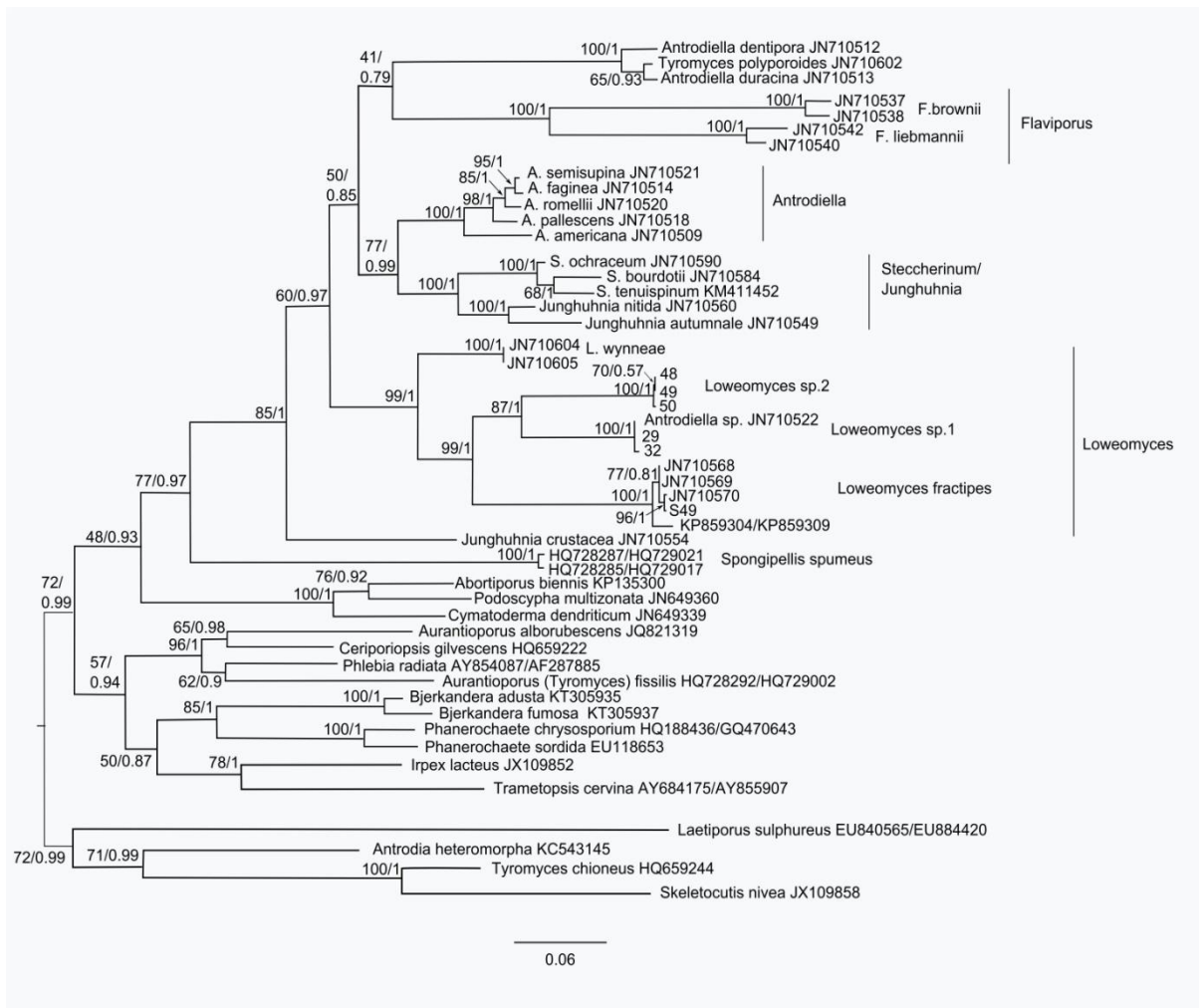


Fig. 1 Phylogenetic tree of ITS-LSU region conducted by Bayesian analysis (for legends to numbers, see Table 1). Numbers at branches indicate maximum likelihood bootstrap proportion and Bayesian posterior probability values. The bar indicates number of expected substitutions per position.

Taxonomy

Loweomyces spissus Westphalen, Tomšovský & Rajchenb. *species novum* (Figs. 2–3)

Holotype: BRAZIL. Paraná: Piraquara, Morro do Canal, 04.IX.2013, M.C. Westphalen 466/13 (SP 446227).

Etymology: *spissus*, refers to the hard consistency of the basidiomes when comparing to other species of the genus.

Basidiomes annual, pileate, sessile, dimidiate, imbricate, sometimes laterally fused, tough and somewhat watery when fresh, becoming dense and sub-woody when dried, up to 6.5 cm wide and 3 cm long. Pileus surface with faintly sulcate zones, smooth or sometimes with irregular and variable tuberculate growths, with a thin hirsute to velutinous layer in younger

specimens, glabrous near the margins, cream-coloured when fresh, becoming slightly paler or unchanging upon drying; margin acute to somewhat lobed, concolourous with the pileus surface, up to 1 mm wide. Context dense, fibrous, homogenous or sometimes with a very thin inconspicuous tomentum formed by the pilear covering hyphae, up to 1.5 mm thick. Pore surface white to cream, pores small, regular, round to angular, 7–9 per mm, dissepiments entire; tubes dense, concolourous with the pore surface, up to 4 mm deep.

Hyphal system dimitic. Generative hyphae clamped, thin to thick-walled, hyaline, unbranched to branched, straight to sinuous, 2–5 μm wide; skeletal hyphae thick walled, often almost solid, hyaline, tortuous to straight, unbranched or with few branches, 3–6 μm wide; hyphae densely arranged and with transitional forms between skeletal and generative hyphae. Thin-walled cystidioles present, sometimes hard to observe, ventricose, lageniform or cylindrical. Basidia clavate, 4-sterigmate, 10–12 \times 4–5.5 μm . Basidiospores widely ellipsoid to subglobose, hyaline, thin-walled, IKI-, 2.5–3.5 \times 2–3 μm .

Habitat: Growing on logs of unidentified angiosperms in areas of *Araucaria* Forest (approximately 1000 m from the sea level)

Comments: *Loweomyces spissus* is characterized by the cream basidiomes that become tough and dense when dried. Its consistency, lack of a distinct tomentum and the small pores distinguish it from other species of the genus. Microscopically, it presents thick-walled hyphae that can be interpreted as true skeletal. However, transitional forms between generative and skeletal hyphae can be observed (Fig. 3f). The hyphae are densely arranged; nevertheless, our observations after NaOH treatment indicate (a) the presence of very long segments with no clamps, and (b) the septa in thick-walled hyphae seem more rare than in *L. tomentosus*. Therefore, we decided to describe this taxon as dimitic. In *L. tomentosus* clamps are more easily observed in the tomentum where hyphae are loosely arranged, so it is possible that the lack of this layer in *L. spissus* and the dense arrangement of hyphae difficult the observation of the clamps.

Examined specimens: BRAZIL. Paraná: Piraquara, Morro do Canal, 04.IX.2013, M.C. Westphalen 468/13 (SP 446229) and M.C. Westphalen 471/13 (446232); Ibid. 26.I.2014, M.C. Westphalen 488/13 (SP 446243)

Loweomyces tomentosus Westphalen, Tomšovský & Rajchenb. *species novum* (Figs. 2–3)

Holotype: BRAZIL. Rio Grande do Sul: São Francisco de Paula, FLONA, 16.IV.2012, M.C. Westphalen 366/12 (SP 446170).

Etymology: *tomentosus*, refers to the conspicuous tomentum layer present in the species.

Basidiomes annual to biannual, pileate, sessile, dimidiate, semicircular, imbricate, very soft when fresh, corky and very light-weighted when dried, up to 8 cm wide and 4.5 cm long. Pileus surface with faintly sulcate zones, soft and watery in fresh specimens, smooth to somewhat velutinate due to the presence of a spongy tomentum formed of matted hyphae, pale yellow when fresh, becoming paler cream when dried; margin acute, white to cream, up to 4 mm wide. Context thick with two distinct layers, upper layer soft and spongy, forming a loose tomentum, up to 1.5 mm thick in dried specimens, when fresh at least 3 mm thick, lower layer very thin, forming a dense region above the tubes, up to 0.5 mm thick. Pore surface white to cream, pores regular, mostly angular, 4–6 per mm, dissepiments entire; tubes somewhat fibrous, concolourous with the pore surface, up to 5 mm deep.

Hyphal system mono-dimitic. Generative hyphae clamped, thin to thick walled, hyaline, smooth, straight to sinuous, branched, more rarely unbranched, thick-walled hyphae with long segments lacking septa which may be interpreted as skeletal hyphae, but sparse clamps also observed on some thick-walled hyphae, clamped hyphae 2.5–5 μm wide, easily observed in the tomentum, aseptate hyphae 3.5–6.5 μm wide, hyphae loosely arranged in the tomentum layer and more densely arranged above the tubes and in the trama. Thin-walled cystidioid elements present, ventricose, fusoid to lageniform and elongated, sometimes difficult to observe. Basidia clavate, 4-sterigmate, 9–12 \times 4–5 μm . Basidiospores ellipsoid, hyaline, thin-walled, IKI-, 3–3.5 \times 2–2.5 μm .

Habitat: Growing on stumps of unidentified angiosperms.

Comments: *Loweomyces tomentosus* is characterized by the soft and somewhat watery basidiomes when fresh with a pale yellow pilear surface and white to cream, large pores. Microscopically it presents very small ellipsoid basidiospores and thick-walled hyphae with infrequent clamps. The clamped hyphae seem more abundant in the tomentum, but it is possible that they are just more easily observed in that layer due to the loose arrangement of hyphae. The hyphal system of this species is complex to define due to the presence of many transitory hyphae between generative and skeletal forms. Even though clamps can be observed in thick-walled hyphae, some wider, 5–6 μm wide, very thick-walled hyphae present in the basidiomes easily break when compressed, making it difficult to verify the presence of clamps. Following the classification by Zmitrovich et al. (2006), it can be defined as sub-dimitic, which is applied when many thick-walled hyphae are rarely septate. The presence of more skeletal-like hyphae distinguishes *L. tomentosus* from *L. fractipes*, which is distinctly monomitic to sub-monomitic, i.e., with presence of slightly thick-walled clamped

supporting hyphae (Zmitrovich et al. 2006). In addition, *L. fractipes* has larger spores ($4.5\text{--}6 \times 4\text{--}5 \mu\text{m}$). *Loweomyces wynneae* differs in spatulate to flabelliform basidiomes with uneven, wavy margins and radially strigose ochraceous pileus surface and the thin and somewhat lacerate dissepiments.

Examined specimens: BRAZIL. Rio Grande do Sul: São Francisco de Paula, FLONA, 30.IV.2012, M.C. Westphalen 382/12 (SP 446181); Viamão, Parque Saint Hilaire, Viamão, 25.V.2009, M.A. Reck 091/09 (ICN).



Fig 2. *Loweomyces spissus* (a) and *Loweomyces tomentosus* (b). Scale bar = 2cm. Pictures by Mateus A. Reck (a) and Larissa T. Perreira (b).

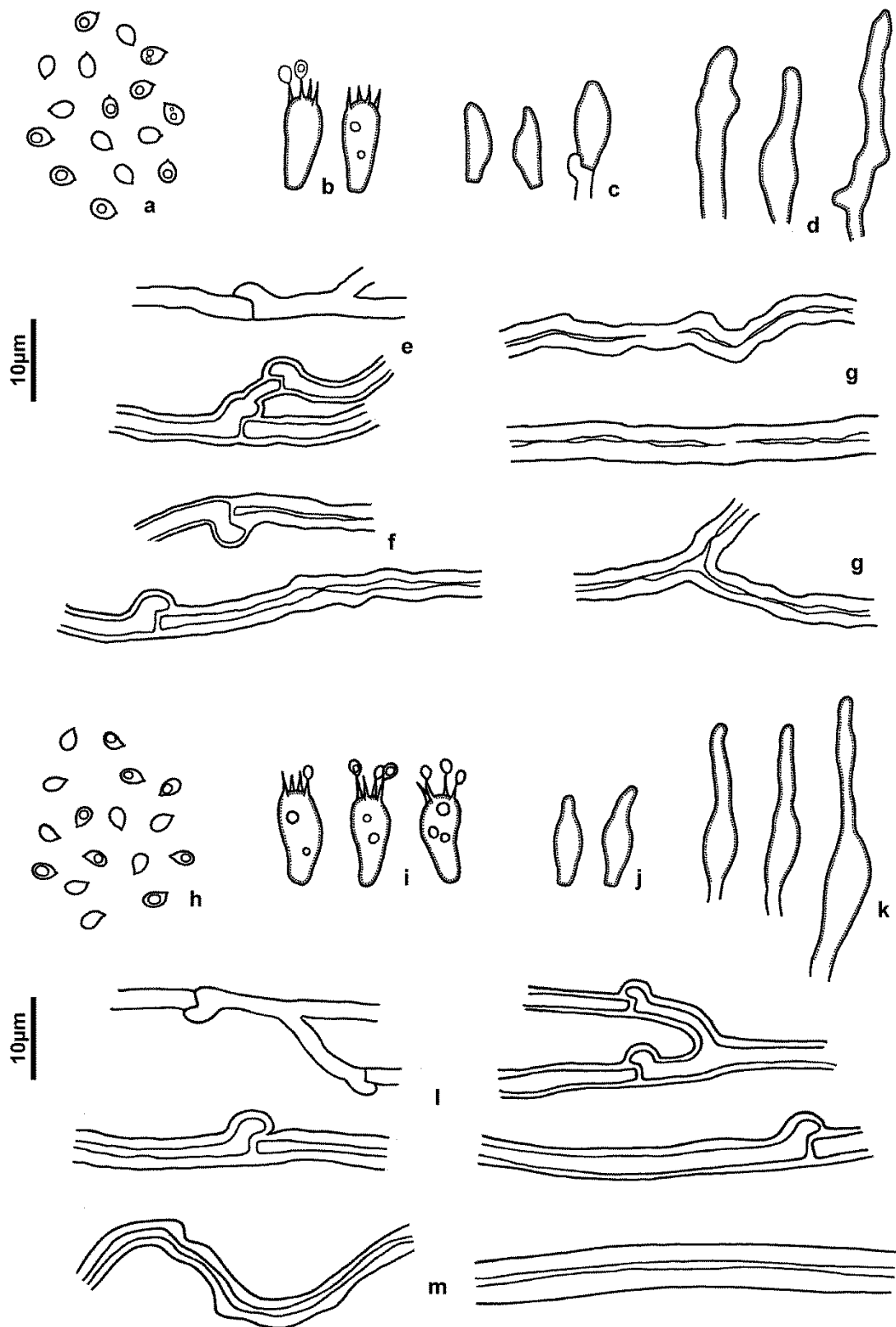


Fig 3. *Loweomyces spissus* (a-g) and *L. tomentosus* (h-m). **a.** Basidiospores. **b.** Basidia. **c.** Cystidioles. **d.** Cystidioid elements. **e.** Generative hyphae. **f.** Transitory hyphae. **g.** Skeletal hyphae. **h.** Basidiospores. **i.** Basidia. **j.** Cystidioles. **k.** Cystidioid elements. **l.** Generative hyphae. **m.** Asseparate skeletal-like hyphae. Illustrations by M.C. Westphalen.

Identification key to species of *Loweomyces*

1. Basidiomes dense, tough when fresh becoming sub-woody when dried, pores 7–9/mm, context homogenous or with a very thin inconspicuous tomentum layer *L. spissus*
1. Basidiomes soft when fresh, light-weighted and somewhat brittle when dried, pores 3–6/mm, context duplex, with a soft tomentum layer and a denser layer above the tubes 2
2. Pileus surface white to cream when fresh, hyphal system strictly monomitic, thick-walled generative hyphae seen on the context and stipe, spores $4.5\text{--}6 \times 4\text{--}5 \mu\text{m}$ *L. fractipes*
2. Pileus surface, pale yellow to ochraceous when fresh, hyphal system mostly dimitic, thick-walled hyphae throughout the basidiomes with variable presence of clamps, spores $3\text{--}3.5 \times 2\text{--}2.5 \mu\text{m}$ 3
3. Basidiomes semicircular, margins entire, pileus surface pale yellow, becoming cream when dried *L. tomentosus*
3. Basidiomes spatulate to flabelliform, margins uneven, pileus surface ochraceous *L. wynneae*

Discussion

Morphological and molecular data obtained in this study corroborate the existence and the need of description of two new species in *Loweomyces*. These are the first species of the genus described from the neotropics, since *L. fractipes* was described from North America (Berkeley 1872) and *L. wynneae* from Europe (Berkeley & Broome 1859). However, sequences labeled as *L. fractipes* from Brazil available in GenBank (KP859304 and KP859309) were added to our dataset. Even though there are small differences in ITS-LSU sequence (approximately 16 different nucleotides between Brazilian and other sequences from North America), it is very similar to *L. fractipes* and some molecular diversity may occur and be expected within the species, especially when comparing specimens from different regions. Unfortunately, the voucher specimen of Brazilian *L. fractipes* could not be located for morphological comparison. More collections and molecular data can help to confirm the diversity of *L. fractipes* in the Neotropics.

The hyphal system in *Loweomyces* seems to be variable and difficult to interpret, with forms from distinctly monomitic to truly dimitic, and often thick-walled hyphae with variable presence of clamp connections. *Loweomyces tomentosus* presents more easily observed clamps in thick-walled hyphae (especially in the tomentum), but long aseptate thick-walled hyphal

sections can also be observed. *Loweomyces spissus* presents a more distinct dimitic hyphal system with thickened hyphae with very long segments without clamps that we interpret as true skeletal hyphae. Nevertheless, clamp connections can also be seen in some thick-walled hyphae, mostly forming a transition between generative and skeletal hyphae, similar to what can be observed in *L. wynneae*. *Loweomyces fractipes* is the only species more distinctly monomitic, presenting abundant clamps and thin to slightly thick-walled hyphae. Ryvarden & Gilbertson (1993) comment on the presence of skeletal-like hyphae with sparse clamps on the stipe of specimens of *L. fractipes*, a feature not observed in the specimen studied. In addition, *L. fractipes* basidiospores and hyphae are described as cyanophilous and the reaction was negative in the Brazilian specimens. However, we also could not observe cyanophily in the studied herbarium specimens of *L. fractipes*, so it is possible that the reaction is variable in the genus.

Cultures (monosporic and polysporic) of the two new neotropical species were obtained from spore prints and both presented a similar growth behaviour. After germination of spores, cultures were kept at 25°C and mycelium growth continued slowly, forming a thick crust where pores started to develop. However, after a short period, the growth stopped and attempts to transfer the mycelium to different new culture media (Malt Extract Agar, Potato Dextrose Agar and Water Agar) were unsuccessful as growth did not occur, preventing further studies. This can be an interesting biological feature of the genus and also a way to distinguish it from *Tyromyces* and *Antrodiella* species. However, to ensure if this is a relevant character and that it applies to all species in *Loweomyces*, further detailed studies are needed. In addition, we believe that studies of mating system and nuclear behaviour with this group would be extremely valuable as it can be a tool to better understand polypore taxonomy and can help in discrimination of morphologically similar genera (Rajchenberg 2011).

In addition to the new species described here, our molecular data (unpubl.) indicate the possible presence of another undescribed Brazilian species in *Loweomyces*. Due to incomplete sampling this species was not included in this study, but the occurrence of that many new species may indicate that the genus has a diversity hotspot in the Neotropics and has been overlooked in these regions. The high morphological similarity of the species described with *Tyromyces* and especially with many *Antrodiella* species may also cause confusion and misidentifications. Therefore, the detailed analysis of the hyphal system in polypores is extremely important. The traditional discrimination of monomitic, dimitic or trimitic hyphal system does not always correspond to hyphal structure of some genera and many intermediary forms may be observed (Zmitrovich et al. 2006). Another example of

hyphal variability in polypores is the genus *Trametopsis* Tomšovský, which presents a dimitic hyphal system with trimitic aspect (Tomšovský 2008).

Although both *L. spissus* and *L. tomentosus* present a different hyphal structure to *L. fractipes*, which may present thick-walled skeletal-like hyphae on the stipe but is more distinctly monomitic, we prefer to keep them under the name *Loweomyces*. Micromorphologically, *L. tomentosus* and *L. spissus* are more similar to *L. wynneae*, while phylogenetically they are closer to *L. fractipes*. Therefore, the relations of the taxa are not clear and there is not enough evidence to separate them in different genera. Future studies with addition of more species to the group and molecular and biological data perhaps can help solving this situation and understanding the evolutionary and morphological relations of species in the *Loweomyces* clade.

Acknowledgements

The authors would like to thank O herbarium for the loan of collections and Dr. Larissa Trierveiler-Pereira and Dr. Mateus A. Reck for the images of fresh basidiomes. FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil. Grant number: 2011/17219-0), European Social Fund and the state budget of the Czech Republic (Project Indicators of trees vitality Reg. No. CZ.1.07/2.3.00/20.0265) are acknowledged for financial support.

References

- Berkeley MJ (1872) Notices of North American fungi. Grevillea. 1(3):33-39
- Berkeley MJ, Broome CE (1859) Notices of British fungi (785-900). Annals and Magazine of Natural History. 3:356-377
- Bernicchia A (2005) Polyporaceae s.l., Fungi Europaei, vol. 10, Candusso, Alassio.
- Binder M, Justo A, Riley R, Salamov A, López-Giráldez F, Sjökvist E, Copeland A, Foster B, Sun H, Larsson E, Larsson KH, Townsend J, Grigoriev IV, Hibbett DS (2013) Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. Mycologia 105:1350–1373. doi:10.3852/13-003
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat. Methods 9(8): 772-772. doi: 10.1038/nmeth.2109

- Dvořák D, Běťák J, Tomšovský M (2014) *Aurantiporus alborubescens* (Basidiomycota, Polyporales) – first record in the Carpathians and notes on its systematic position. – Czech Mycol. 66(1): 71–84.
- Floudas D, Hibbett DS (2015) Revisiting the taxonomy of *Phanerochaete* (Polyporales, Basidiomycota) using a four gene dataset and extensive ITS sampling. Fungal Biology: 119: 679-719.
- Gilbertson RL, Ryvarden L (1986) North American polypores. *Abortiporus – Lindtneria*. Oslo, Fungiflora, v.1, 433pp.
- Guindon S, Gascuel O (2003) PhyML: A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic Biology 52 (5): 696-704. doi: 10.1080/10635150390235520
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.3: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61: 539–542. doi: 10.1093/sysbio/sys02
- James TY, Lee M, Diepen LTA (2011) A single mating-type locus comprised of homeodomain genes promotes nuclear migration and heterokaryosis in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Eukaryot. Cell 10: 249-261. doi: 10.1128/EC.00212-10
- Jülich W (1982) Notes on some Basidiomycetes (Aphyllophorales and Heterobasidiomycetes) Persoonia. 11(4):421-428
- Kotlába F, Pouzar Z (1976) On the taxonomic position of *Polyporus fractipes*. Memoirs of the New York Botanical Garden. 28:119-128.
- Larsson KH (2007) Re-thinking the classification of corticioid fungi. Mycological Research 111: 1040–1063 (doi: 10.1016/j.mycres.2007.08.001).
- Miettinen O, Rajchenberg M (2012) *Obba* and *Sebipora*, new polypore genera related to *Cinereomyces* and *Gelatoporia* (Polyporales, Basidiomycota) Mycol Progress 11:131–147. doi: 10.1007/s11557-010-0736-8
- Miettinen O, Larsson E, Sjökvist E, Larsson KH (2012) Comprehensive taxon sampling reveals unaccounted diversity and morphological plasticity in a group of dimitic polypores (Basidiomycota, Polyporales), Cladistics 28:251–270. doi: 10.1111/j.1096-0031.2011.00380.x
- Moncalvo J-M, Lutzoni FM, Rhener SA, Johnson J, Vilgalys R (2000) Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. Syst Biol 49: 278–305.

- Rauschert S (1988) Neue Namenskombinationen bei Höheren Pilzen. *Haussknechtia*. 4:51-55
- Ryvarden L, Gilbertson RL (1993) *European Polypores.*, Synopsis Fungorum 6. Oslo, Fungiflora, v.1., 387pp.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres D, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Sjökvist E, Larsson E, Eberhardt U, Ryvarden L, Larsson KH (2012) Stipitate stereoid basidiocarps have evolved multiple times. *Mycologia* 104: 1046–1055.
- Spirin V, Vlasák J, Niemelä T, Miettinen O (2013) What is *Antrodia* sensu stricto? *Mycologia* 105:1555– 1576
- Tomšovský M (2008) Molecular phylogeny and taxonomic position of *Trametes cervina* and description of the new genus *Trametopsis*. *Czech Mycology*. 60(1):1-11
- Tomšovský M (2012) Delimitation of an almost forgotten species *Spongipellis litschaueri* (Polyporales, Basidiomycota) and its taxonomic position within the genus. *Mycological Progress* 11(2): 415–424.
- Tomšovský M, Jankovský L (2008) Validation and typification of *Laetiporus montatus*. *Mycotaxon* 106: 289-295
- Tomšovský M, Kolařík M, Paňoutová S, Homolka L (2006) Molecular phylogeny of European *Trametes* (Basidiomycetes, Polyporales) species based on LSU and ITS (nrDNA) sequences. *Nova Hedwigia* 82: 269-280.
- Tomšovský M, Menkis A, Vasaitis R (2010a) Phylogenetic relationships in European *Ceriporiopsis* species inferred from nuclear and mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Fung. Biol.* 114:350–358. doi: 10.1016/j.funbio.2010.02.004
- Tomšovský M, Sedlák P, Jankovský L (2010b) Species recognition and phylogenetic relationships of European *Porodaedalea* (Basidiomycota, Hymenochaetales). *Mycological Progress* 9(2): 225-233. doi: 10.1007/s11557-009-0628-y
- Zmitrovich IV, Malysheva VF, Spirin WA (2006) A new morphological arrangement of the Polyporales. I. Phanerochaetinae. *Mycena* 6:4-56

CAPÍTULO II

- Artigo submetido para o periódico Fungal Biology -

Extensive characterization of the new genus *Rickiopora* (Polyporales)

Mauro C. Westphalen¹ *, Mario Rajchenberg², Michal Tomšovský³ & Adriana M. Gugliotta¹

¹ Núcleo de Pesquisa em Micologia, Instituto de Botânica, Av. Miguel Estefano 3687, 04301-90, São Paulo, SP, Brazil. *Corresponding author: maurowestphalen@yahoo.com.br

² Área de Protección Forestal, Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico, C.C. 14, 9200 Esquel, Chubut, Argentina

³ Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 3, CZ-61300, Czech Republic

Abstract

Ceriporiopsis latemarginata and *Antrodiella angulatopora* are two polypore species described from the Neotropics that present very similar morphological features and have been considered as synonyms by some authors. They are characterized by the effused-reflexed basidiomes, large angular pores, small ellipsoid to ovoid basidiospores and a monomitic hyphal system with presence of thick-walled hyphae with infrequent clamps. *Antrodiella* s.s. is characterized by strictly dimitic species with thin to slightly thick-walled generative hyphae, while *Ceriporiopsis* has a distinct monomitic hyphal system and resupinate basidiomes. In order to verify the evolutionary relations of *C. latemarginata* and to find its taxonomic placement, morphological, biological and phylogenetic studies were carried out. Sporeprints from fresh basidiomes were obtained and used to prepare monosporic and polysporic cultures. Cultures were described and used for mating system and nuclear behavior studies, as well as for DNA sequence analyses of internal transcribed spacer and large subunit of ribosomal RNA gene, translation elongation factor 1-alpha gene and RNA polymerase II second largest subunit-like gene. Type specimens of *C. latemarginata* and *A. angulatopora* were morphologically examined and their synonymy was confirmed. The results obtained support the description of new polypore genus *Rickiopora* in the residual polyporoid clade, characterized by a bipolar mating system and astatocoenocytic nuclear behavior.

Key words: Taxonomy, Polyporales, Residual polyporoid clade, mating system

Introduction

Daedalea latemarginata Rick was described from Southern Brazil (Rick 1960) and later transferred to *Ceriporiopsis* Domański (Rajchenberg 1987). It is characterized by effused-reflexed basidiomes, large, angular and somewhat irregular pores, small ellipsoid to ovoid basidiospores, monomitic hyphal system and by causing a white rot. These features greatly differ from *Daedalea*, which presents species with irregular pores and trimic hyphal system which cause a brown rot (Ryvarden & Gilbertson 1993). Ryvarden (1987) described *Antrodiella angulatopora*, a species with very similar morphological features, from Venezuela. Even though it was characterized as dimitic, the author commented on the presence of clamped, thick-walled hyphae in the context. Later, based on type studies, Rajchenberg & Meijer (1990) proposed *A. angulatopora* as a synonym of *C. latamarginata* but commented the generic placement of the species as unclear, since the characters did not seem to fit neither *Antrodiella* Ryvarden & I. Johans. nor *Ceriporiopsis*. *Antrodiella* s.s. is characterized by dimitic species with thin to slightly thick-walled generative hyphae and abundant aseptate skeletal hyphae. *Ceriporiopsis* is characterized by resupinate basidiomes and monomitic hyphal system, but also includes species with thick-walled hyphae. However, *Ceriporiopsis* as traditionally conceived (Ryvarden and Gilbertson 1993, 1994) is polyphyletic and includes species from different clades of Polyporales and with variable morphology (Tomšovský et al. 2010a). The type species of the genus, *C. gilvescens* (Bres.) Domański, is characterized by whitish soft, somewhat watery and waxy basidiomes, that become darker when touched or dried, and a strictly monomitic hyphal system with thin to slightly thick-walled hyphae that appear agglutinated in dried specimens. Therefore, morphologically, *C. latemarginata* does not seem to fit in any of the genera currently described, and its phylogenetic position is unknown. Recently, fresh specimens of *C. latemarginata* were collected in São Paulo State, Southeastern Brazil and studied. Morphological, phylogenetic and culture data obtained support the description of a new polypore genus. In addition, type studies were carried out in order to confirm the synonymy of *A. angulatopora* and *C. latemarginata* and the identity of the new collections.

Material and Methods

Specimens were collected in São Paulo State, Southeastern Brazil. Additional specimens from FLOR and SP herbaria as well as the types of *Ceriporiopsis latemarginata* (PACA) and

Antrodiella angulatopora (NY) were studied for morphological description and comparison (Thiers 2015). For micromorphological studies, hand-cut sections of the basidiomes were prepared on microscope slides with 3% KOH solution and stained with 1% aqueous phloxin. Cresyl blue was used for observation of metachromatic reactions. All microscopic structures observed were measured with aid of an eyepiece micrometer and drawn with the aid of a drawing tube. The abbreviations and codes used for the measurements are as following: $Lm \times Wm$ = means of length and width, Q = range of length/width ratios, Qm = length/width mean, and $n = x/y$ (x = number of measurements from a given number (y) of specimens). Fresh sporerpints were obtained and used for preparation of monosporic and polysporic cultures. Cultures were grown in malt extract agar (MEA) or potato dextrose agar (PDA) at 25°C. Mating system tests were performed following Hallenbeg (1984). Nuclear staining and nuclear behaviour classification followed Boidin (1958, 1971). Culture studies followed Nobles (1965). For phylogenetic studies, DNA extraction from cultures and basidiomes was performed using DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) and Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO), respectively. When necessary, DNA was purified using DNA Clean & Concentration Kit (Zymo Research). DNA amplification of the internal transcribed spacer (ITS) and large subunit (LSU) regions of ribosomal RNA gene were performed using ITS5/ITS4-Basidio (Nikolcheva and Bärlocher 2004) primer combination for ITS and LR0R/LR6 for LSU. The PCR regimes followed Tomšovský et al. (2010a). For translation elongation factor 1-alpha gene (*tef1*; primers: 983F/2218R), touchdown PCR with gradually reduced annealing temperature (60–50°C) was performed (Rehner & Buckley 2005). For RPB2 (primers fRPB25F, bRPB271R), a touch-down protocol modified from EF- α protocol by Rehner & Buckley (2005) was performed. In some cases when PCR did not present acceptable results, a nested PCR was performed according to Tomšovský et al. (2010b). Amplified PCR products were purified and sequenced in MacroGen Ltd. (South Korea). The sequences obtained were initially edited in the BioEdit software (Hall 1999) and adjusted manually. Additional sequences used in this study (Table 1) were chosen based on Miettinen et al. (2012), Binder et al. 2013, Floudas & Hibbet (2015) and through BLAST searches in the NCBI database (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Two dataset of DNA sequences were using either ITS-LSU and combined four molecular markers (ITS-LSU-*tef1*-RPB2). The datasets were aligned using MAFFT version 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) and used for the construction of phylogenetic trees applying Bayesian inference in the MrBayes 3.2.2 software (Ronquist et al. 2012). The analysis was run for 5 million generations, sampling every 500 generations. Burnin was set to

10% of the trees. For ITS-LSU dataset additionally Maximum Likelihood analysis was conducted in PhyML (Guindon & Gascuel 2003). The evolutionary models were inferred with the jModelTest 2.c1.4 (Darriba et al. 2012) and the best fit model chosen for both datasets was GTR + I + G.

Table 1 List of sequences used in this study. Specimen codes refer to collection numbers found on GenBank. *Sequences obtained in this study.

Specimen	GenBank No.			
	ITS	LSU	tef1- α	rbp2
<i>Antrodia serialis</i> (KHL 12010)	JX109844	JX109844	JX109898	JX109870
<i>Antrodiella americana</i> (KHL 11949)	JN710509	JN710509	JN710711	
<i>Abortiporus biennis</i> (FD-319)	KP135300	KP135300		KP134893
<i>Antrodiella duracina</i> (LR 43589)	JN710513	JN710513		
<i>Antrodiella faginea</i> (KHL 11977)	JN710514	JN710514	JN710712	
<i>Antrodiella foliaceodentata</i> (X1238)	JN710515	JN710515		
<i>Antrodiella ichnusana</i> (RS 13892)	JN710516	JN710516		
<i>Antrodiella onychoides</i> (OM 2312)	JN710517	JN710517		
<i>Antrodiella pallescens</i> (X1080)	JN710518	JN710518		
<i>Antrodiella romellii</i> (OM 7429)	JN710520	JN710520		
<i>Antrodiella semisupina</i> (JL 372)	JN710521	JN710521		
<i>Aurantioporus (Tyromyces) fissilis</i> (BRNM 699803)	HQ728292	HQ729002		
<i>Bjerkandera adusta</i> BRNM 771948	KT305935	KT305935	KT305938	
<i>Bjerkandera fumosa</i> BRNM 771947	KT305937	KT305937		
<i>Byssomerulius corium</i> (FP-102382)	KP135007	KP135230		KP134921
<i>Ceriporia viridans</i> (KHL 8765)	AF347109	AF347109		
<i>Ceriporiopsis balaenae</i> (TN 2750)	FJ496668	FJ496718		
<i>Ceriporiopsis consobrina</i> (R 977)	FJ496667	FJ496716		
<i>Ceriporiopsis gilvescens</i> (TN 5516)	HQ659222	HQ659222		
<i>Cerrena consors</i> (LYW 10)	FJ821528	FJ821517		
<i>Cerrena unicolor</i> (KHL-GB.)	JQ031127	JQ031127	JX109891	JX109863

<i>Climacocystis borealis</i> (KHL 13318)	JQ031126	JQ031126	JX109909	JX109880
<i>Cymatoderma dendriticum</i> (CBS 207.62)	JN649339	JN649339		
<i>Daedalea quercina</i> (OM 12662)	JX109855	JX109855		
<i>Diplomitoporus crustulinus</i> (FD-137)	KP135299	KP135211		
<i>Flaviporus brownii</i> (TL 9883)	JN710537	JN710537		
<i>Flaviporus brownii</i> (X462)	JN710538	JN710538		
<i>Flaviporus liebmannii</i> (LR 44553)	JN710540	JN710540		
<i>Frantisekia mentschulensis</i> (AH 1377)	JN710544	JN710544		
<i>Gleoporus taxicola</i> (SK 0075)	JX109847	JX109847	JX109901	JX109873
<i>Hypochnicium geogenium</i> (MA 48308)	FN552534	JN939576		
<i>Hypochnicium lyndoniae</i> (NL 041031)	JX124704	JX124704	JX109905	
<i>Hypochnicium subrigescens</i> (KHL 11968)	JQ031128	JQ031128	JX109906	
<i>Hypochnicium wakefieldiae</i> (MA 7675)	FN552531	JN939577		
<i>Hyphoderma litschaueri</i> (FP-101740)	KP135295	KP135219		KP134965
<i>Hyphoderma medioburiense</i> (FD-335)	KP135298	KP135220		KP134966
<i>Hyphoderma mutatum</i> (HHB-15479)	KP135296	KP135221		KP134967
<i>Hyphoderma setigerum</i> (FD-312)	KP135297	KP135222		
<i>Hyphodermella corrugata</i> (KHL 3663)	EU118630	EU118630		
<i>Irpex lacteus</i> (DO 421/951208)	JX109852	JX109852	JX109911	JX109882
<i>Junghuhnia crustacea</i> (OM 2954)	JN710553	JN710553		
<i>Meripilus giganteus</i> (FP-135344)	KP135307	KP135228		KP134894
<i>Mycoacia fuscoatra</i> (KHL 13275)	JN649352	JN649352	JX109908	JX109879
<i>Panus conchatus</i> (OM 13966)	JN710579	JN710579		
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (BKM-F-1767)	HQ188436	GQ470643	HQ188379	
<i>Phlebia nitidula</i> (N 020830)	EU118655	EU118655		
<i>Phlebia radiata</i> (FPL 6140)	AY854087	AF287885	AY885156	AY218502
<i>Phlebia uda</i> (FP-101544)	KP135361	KP135232		KP134909
<i>Phlebioporia bubalina</i>	KC782526	KC782528		

(YCD 13168)				
<i>Physisporinus sanguinolentus</i> (KHL 11913)	JX109843	JX109843	JX109897	
<i>Podoscypha multizonata</i> (Jahn 751012)	JN649360	JN649360		
<i>Podoscypha venustula</i> (LR 40821)	JX109851	JX109851	JX109910	
<i>Pouzaroporia (Ceriporiopsis)</i> <i>subrufa</i> (BRNM 710172)	FJ496662	FJ496724		
<i>Rhizochaete radicata</i> (FD-123)	KP135407	KP135279		KP134937
<i>Rickiopora latemarginata*</i> (RP 56)				
<i>Rickiopora latemarginata*</i> (RP 58)				
<i>Rickiopora latemarginata*</i> (RP 110)				
<i>Scopuloides rimosa</i> (HHB-7042)	KP135350	KP135282		KP134903
<i>Skeletocutis nivea</i> (ES2008-1)	JX109858	JX109858	JX109915	JX109886
<i>Spongipellis delectans</i> (HHB-10489)	KP135301	KP135287		KP134969
<i>Spongipellis litschaueri</i> (BRNM 670693)	HQ728303	HQ728303		
<i>Spongipellis pachyodon</i> (AFTOL-ID 705)	DQ249277	AY629322	DQ028599	DQ408123
<i>Spongipellis spumeus</i> (BRNM 712630)	HQ728288	HQ728288		
<i>Steccherinum neonitidum</i> (MCW 370/12)				
<i>Steccherinum nitidum</i> (FP-105195)	KP135323	KP135227		
<i>Steccherinum nitidum</i> (KHL 11903)	JN710560	JN710560	JN710721	
<i>Steccherinum ochraceum</i> (KHL 11902)	JN710590	JN710590	JN710730	JN710738
<i>Steccherinum robustius</i> (G 1195)	JN710591	JN710591		
<i>Steccherinum undigerum</i> (MCW 426/13)				
<i>Trametopsis cervina</i> (TJV 93216T)	JN165020	JN164796	JN164882	JN164877

Results

Morphological, molecular and biological data obtained confirmed the isolated position of *C. latemarginata* within Polyporales, in the residual polyporoid clade (Figs. 1 and 2). Therefore the new genus *Rickiopora* is proposed. In addition, type studies support that *A. angulatopora*

is a synonym of *C. latemarginata*, in agreement with Rajchenberg & Meijer (1990). Further comments, full descriptions, illustrations and images are presented below.

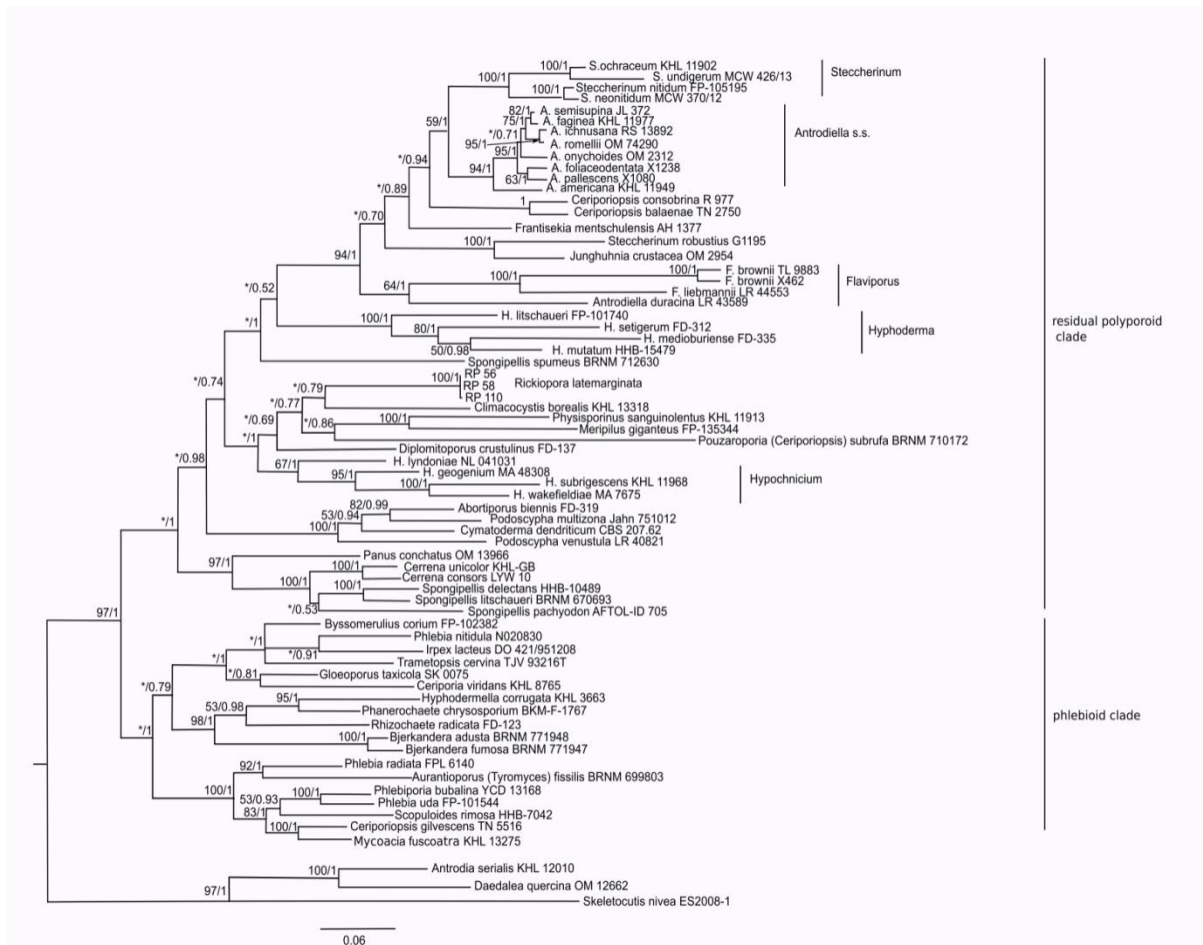


Fig 1. Phylogenetic tree of ITS-LSU region conducted by Bayesian analysis (for legends to numbers, see Table 1). Numbers at branches indicate maximum likelihood bootstrap proportion and Bayesian posterior probability values. The asterisk (*) marks different topology in both analyses. The bar indicates number of expected substitutions per position.

metachromatic, IKI-. Cystidia absent, but cystidioles with variable shape abundant in the hymenium. Basidiospores subglobose to ellipsoid, hyaline, smooth, thin-walled. IKI-.

Comments: *Rickiopora* is characterized by effused-reflexed basidiomes, often with large resupinate parts, with angular and somewhat splitted pores and the presence of a monomitic hyphal system with thin- to thick-walled metachromatic generative hyphae. The hyphal system in the genus can be complex and may cause confusion, since many thick-walled hyphae present sparse clamps, forming some rather long, aseptate segments that may be interpreted as true skeletal hyphae. However, a careful observation reveals the presence of clamp connections in very thick-walled hyphae as well. Zmitrovich et al. (2006) proposed a more detailed classification for complex hyphal system structures, but none of the descriptions provided fit that of *Rickiopora*, since the authors did not consider the presence of rather thick-walled hyphae, resembling to skeletal, but with presence of clamps. Here we decided to classify the genus as monomitic to pseudo-dimitic, considering pseudo-dimitic a hyphal system with a general appearance of a dimitic one that, with a detailed observation, reveals that no true skeletals are present. Phylogenetically, *Rickiopora* is included in the residual polyporoid clade (Binder et al. 2013) and does not group close to any of the known polypore genera with available DNA sequences.

Rickiopora latemarginata (Rick) Westphalen, Tomšovský & Rajchenb. comb. nov. Figs. 3–4
 ≡ *Daedalea latemarginata* Rick, Iheringia 7: 263 (1960). Basionym (PACA!)
 = *Antrodiella angulatopora* Ryvardeen, Mycotaxon 28 (2): 525 (1987) (NY!)

Basidiomes pileate, effused-reflexed, partly dorsally attached, often with a wide resupinate part, up to 12 cm wide, with reflexed margins, thin and somewhat soft flexible when fresh, becoming corky, rigid and somewhat brittle upon drying. Pileus surface faintly zonate, glabrous to finely tomentose, white to cream when fresh, becoming beige to pale brown when dried, pileus up to 4 cm wide and 4 mm thick, shrinking and curling when dried; margin wide, acute to slightly lobed. Context thin, homogeneous, white to straw colored, up to 2 mm thick, sometimes with a loose thin tomentum on the top. Pore surface concolor with the pileus surface, pores regular or most commonly irregular and somewhat splitted, sometimes forming daedaloid areas, angular or more rarely round, with thin dissepiments, 2–4 per mm; tubes concolor with the pore surface, up to 2 mm deep.

Hyphal system monomitic to pseudo-dimitic. Generative hyphae clamped, hyaline, commonly branched, in the trama mostly thin or only slightly thick-walled, in the context

thick-walled with sparse clamps, sometimes presenting long segments without septa that may be interpreted as skeletal hyphae, metachromatic, 2–6 μm in diam. Cystidia absent; thin-walled cystidioles present, fusoid, cylindrical, lageniform or with a round apex, 11–16 \times 4–7 μm . Basidia clavate, 4-sterigmate, 14–16 \times 4–6 μm . Basidiospores ovoid to widely ellipsoid, hyaline, thin-walled, 3.0–4.0 \times 2.0–3.0 μm , $L_m \times W_m = 3.62 \times 2.68$, $Q = 1.17 - 1.40$, $Q_m = 1.36$, $n = 25/1$.

Habitat: Growing on dead logs of unidentified angiosperms.

Distribution: Known from Brazil, Venezuela, Argentina and Costa Rica (Rajchenberg 1987, Ryvarden 1987, Carranza-Velásquez & Ruiz-Boyer 2005, Motato-Vasquez et al. 2014).

Cultural features

Strains (polysporic cultures): Cultures RP56 (CIEFAPcc 537, simultaneously kept in CCBAS, strain no. 125) and RP58 (CIEFAPcc 538 and CCBAS 134)

Growth rapid, covering the dish in 3 weeks. Reverse bleaching. Margin cobwebby, irregular to regular. Mat mostly subfelty, poor, translucent; becoming slightly felty backwards or, mostly, developing felty or spotty tufts of white mycelium. Odor none or slightly fruity.

Microscopic features: Mat formed exclusively by generative hyphae that are and remain simple septate through most of the study; only developing clamps by week 6 (only on culture RP56). Hyphae 2-4-6 μm diam., much branched, with many H connections, many simple septa well delimited/marked by a slight constriction. Some hyphae incrustated with polyhedral crystals, sparsely distributed on the hyphae. Walls hyaline, thin-, distinct to slightly thick-walled. Regularly clamped hyphae similar, branched, also with H connections and, some, with incrustations. Chlamydospores present but unabundant, solitary or several formed together, mostly globose, with a slight thickened wall, 5–8 \times 6–11 μm .

Code: 2. 4. 7. 34. 36. 43. 50. 54. 59. 65

Oxidases: Gallic acid: ++ - +++ Tannic acid: +

Mating system: Bipolar. Sporeprints from specimens SP 445968 and SP 445970 were studied, with nine and ten monosporic cultures confronted, respectively. Mating types were distributed as following:

(SP 445968) A₁: 1, 2, 5, 6; A₂: 3, 4, 7, 8, 9

(SP 445970) A₁: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10; A₂: 3, 6, 9

Nuclear behavior: Astatocoenocytic

Nuclei in monosporic cultures: the hyphal segments are multinucleate; some assays of number of nuclei from the terminal cells backwards are as follows: ←7-6-3, ←13-2-2-2-3-6-, ←8-2-4-3-

Nuclei in polysporic cultures: either in aerobic or anaerobic conditions the mycelia formed simple-septate segments. Some assays of number of number of nuclei from the terminal cells backwards are: ←11-7-2-, ←5-7-3-



Fig 3. *Rickiopora latemarginata* macroscopic aspect. Scale bar 2 cm. Picture by R.M. Pires.

Comments: Macroscopically, *R. latemarginata* resembles large and dense basidiomes of *Junghuhnia undigera* (Berk. & M.A. Curtis) Ryvardeen. However, microscopically both species are easily distinguished by the presence of cystidia and a distinct dimitic hyphal system in the latter. The presence of some long, aseptate segments in the generative hyphae may cause confusion in its identification, as the hyphal system may be interpreted as dimitic, reason why this species was also described in *Antrodiella*. However, the presence of clamps in thick-walled hyphae can be easily observed with a more detailed examination. In addition, the metachromatic hyphae are another distinctive feature, because the reaction does not occur in *Antodiella* s.s. The combination of effused-reflexed basidiomes with large angular pores,

the hyphal structure and metachromatic reaction, the thin-walled basidiospores and the bipolar mating system and astatocoenocytic nuclear behavior are unique features of the species that can distinguish it from other polypores.

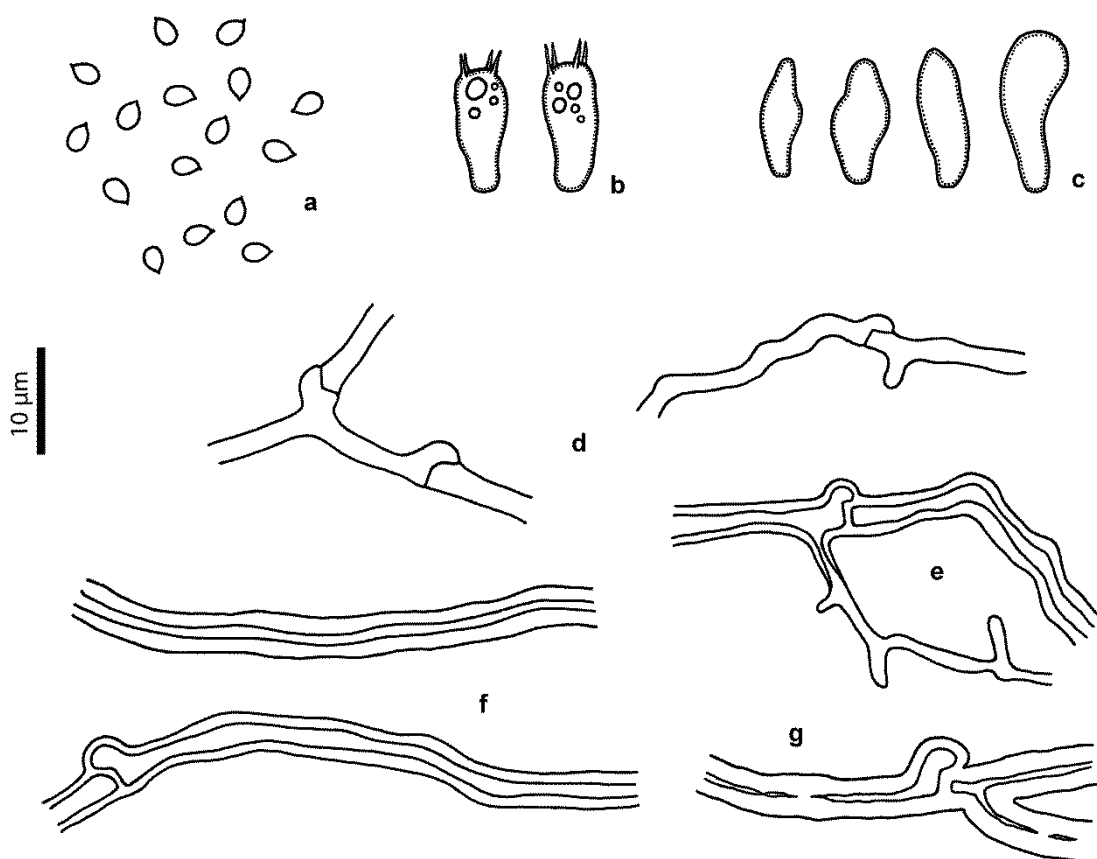


Fig 4. *Rickiopora latermarginata* microscopic features. **a.** Basidiospores. **b.** Basidia. **c.** Cystidioles. **d.** Thin-walled generative hyphae. **e.** Thick-walled generative hyphae from the trama. **f.** Thick-walled generative hyphae with skeletal-like segments. **g.** Thick-walled generative hyphae from the context. Illustrations by M.C. Westphalen.

Examined specimens: BRAZIL. Rio Grande do Sul, São Salvador, J. Rick FR 20230, Jun.1943 (PACA, holotype). São Paulo: Cananéia, P.E. da Ilha do Cardoso, 26.XI.1991, A.M. Gugliotta & M. Capelari 364 (SP 250562); *ibid.*, 27.XI.1991, A.M. Gugliotta & M. Capelari 370 (SP 250563); *ibid.*, 28.XI.1991, A.M. Gugliotta & M. Capelari s.n. (SP 250458); São Luiz do Paraitinga, P.E. da Serra do Mar, Núcleo Sta Virgínea, 11.VI.2013, R.M. Pires & C.M. Ishida RP56 (SP 445968) and RP58 (SP 445970); *ibid.*, 07.VIII.2013, R.M. Pires et al. RP110 (SP 446269); *ibid.*, 26.IV.2014, R.M. Pires RP310 (SP 466236); São Paulo, Parque Estadual da Cantareira, 6.XII.2011, V. Motato-Vásquez 70 (SP 417945); *ibid.* 30.I.2012, V. Motato-Vásquez 112 (SP417946); *ibid.*, 26.IV.2012, V. Motato-Vásquez 175 (SP417947); *ibid.*, 30.VII.2012, V. Motato-Vásquez & M.C. Westphalen 261 (SP 417948).

VENEZUELA. Sucre: Trail between Manacal and Los Pocitos, NW. of Irapa, K. P. Dumont et al. VE6037, 13.VII.1972 (*A. angulatopora* – NY 815406 holotype, O F-500672 isotype.). Aragua, Parque Nacional H. Pittier, L. Ryvardeen 40765, 25.Apr.1998 (O).

Discussion

Our data support the placement of *C. latemarginata* in a new genus. Phylogenetically *Rickiopora* is placed in the residual polyporoid clade; however, it is not closely related to any of the sequenced genus occurring in this clade. Therefore, more phylogenetic studies including the group may change its position within the clade and clarify its evolutionary relations in the future. Furthermore, most genera of the residual polyporoid clade are characterized by tetrapolar mating system and normal nuclear behavior, while *Rickiopora* is bipolar and astatocoenocytic. In the residual polyporoid clade, this combination of characters also occurs in some species of *Spongipellis*, which can be distinguished morphologically by their distinct monomitic basidiomes and presence of thick-walled, cyanophilous basidiospores. However, *Spongipellis* is polyphyletic and the evolutionary relations of some of its taxa are not well resolved (Tomšovský 2012, Binder et al. 2013), which may explain why it includes both bipolar and tetrapolar species (Rajchenberg 2011).

Morphologically, *Rickiopora* can be confused with *Antrodiella* due to morphological similarities such as the whitish effused-reflexed basidiomes and the presence of thick-walled hyphae that might give the hyphal system a general dimitic appearance. However, a detailed examination reveals the presence of clamps in many of the thick-walled hyphae observed, and there is no clear distinction between generative and the seemingly skeletal hyphae. For that reason we consider this a monomitic hyphal system with presence of variable generative hyphae. In addition, *Rickiopora* presents metachromatic hyphae, a feature absent in *Antrodiella*. The hyphal structure also differentiates *Rickiopora* from *Ceriporiopsis* s.s. Although *Ceriporiopsis* s.l. is highly polyphyletic (Tomšovský et al. 2010a, Zhao and Cui 2014), none of the sequenced species of *Ceriporiopsis* is related to *Rickiopora*. *Ceriporiopsis* s.s. is nested in the phlebioid clade, as previously shown by the former authors. The phylogenetic position of *Rickiopora* also indicates that much data is still lacking for a better understanding of the evolutionary and morphological relations within the Polyporales. In addition, features such as types of mating system and nuclear behavior are important for a better understanding of their biology and are useful for discrimination of morphologically similar genera.

Acknowledgements

The authors would like to thank PACA and NY herbaria for the loan of type specimens and MSc. Ricardo M. Pires for the picture of the fresh basidiome. FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil. Grant numbers: 2011/17219-0), European Social Fund and the state budget of the Czech Republic (Project Indicators of trees vitality Reg. No. CZ.1.07/2.3.00/20.0265) are acknowledged for financial support.

References

- Binder M, Justo A, Riley R, Salamov A, López-Giráldez F, Sjökvist E, Copeland A, Foster B, Sun H, Larsson E, Larsson KH, Townsend J, Grigoriev IV, Hibbett DS, 2013. Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. *Mycologia* 105:1350–1373. doi:10.3852/13-003
- Boidin J. 1958. Essai biotaxonomique sur les Hydnés résupinés et les Corticiés. *Revue de Mycologie. Mémoire Hors Série* 6,1–387.
- Boidin J, 1971. Nuclear behavior in the mycelium and the evolution of Basidiomycetes. In: Petersen RH, ed. *Evolution in the higher Basidiomycetes*. Knoxville: Univ. Tennessee Press. p 129–148.
- Carranza-Velásquez, J. and A. Ruiz-Boyer, 2005. Checklist of polypores of Costa Rica. *Revista Mexicana de Micología* 20:45–52.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D, 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9(8): 772–772. doi: 10.1038/nmeth.2109
- Floudas D, Hibbett DS, 2015. Revisiting the taxonomy of *Phanerochaete* (Polyporales, Basidiomycota) using a four gene dataset and extensive ITS sampling. *Fungal Biology* 119(8): 679-719. doi:10.1016/j.funbio.2015.04.003
- Guindon S, Gascuel O, 2003. PhyML: A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52 (5): 696-704.
- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hallenberg N, 1984. Compatibility between species of Corticiaceae s. l. (Basidiomycetes) from Europe and North America. *Mycotaxon* 21:335-388
- Miettinen O, Larsson E, Sjökvist E, Larsson KH, 2012. Comprehensive taxon sampling reveals unaccounted diversity and morphological plasticity in a group of dimitic polypores

- (Basidiomycota, Polyporales), *Cladistics* 28:251–270. doi: 10.1111/j.1096-0031.2011.00380.x
- Motato-Vasquez V, Pires RM, Gugliotta AM, 2014. Polypores from an Atlantic rainforest area in southeast Brazil: pileate species. *Brazilian Journal of Botany* 38(1): 149-164. doi: 10.1007/s40415-014-0109-7
- Nikolcheva LG, Bärlocher F, 2004. Taxon-specific primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. *Mycol Prog* 3:41–49. doi:10.1007/s11557-006-0075-y
- Nobles MK, 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Canadian Journal of Botany* 43 (9): 1097–1139. doi:10.1139/b65-126
- Rajchenberg M, 1987. Type studies of Polyporaceae (Aphyllorphales) described by J. Rick. *Nordic J. Bot.* 7: 553–568.
- Rajchenberg M, 2011. Nuclear behavior of the mycelium and the phylogeny of Polypores (Basidiomycota). *Mycologia* 103(4): 677–702. doi: 10.3852/10-310
- Rajchenberg M, de Meijer AAR, 1990. New and noteworthy polypores from Paraná and São Paulo States, Brazil. *Mycotaxon* 38: 173–185.
- Rehner SA, Buckley EP, 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97:84–98. doi: 10.3852/mycologia.97.1.84
- Rick J, 1960. Basidiomycetes Eubasidii in Rio Grande do Sul – Brasilia 4. Meruliaceae, Polyporaceae e Boletaceae. *Iheringia Série Botânica* 7: 193-295.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres D, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP, 2012. MrBayes 3.3: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61: 539–542. doi: 10.1093/sysbio/sys02
- Ryvarden L, 1987. New and noteworthy polypores from tropical America. *Mycotaxon* 28:525–541
- Ryvarden L, Gilbertson RL, 1993. European Polypores., *Synopsis Fungorum* 6. Oslo, Fungiflora, v.1., 387pp.
- Thiers B, 2015. Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/ih/>
- Tomšovský M, Menkis A, Vasaitis R, 2010a. Phylogenetic relationships in European *Ceriporiopsis* species inferred from nuclear and mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Fung. Biol.* 114:350–358. doi: 10.1016/j.funbio.2010.02.004

Tomšovský M, Sedlák P, Jankovský L, 2010b. Species recognition and phylogenetic relationships of European *Porodaedalea* (Basidiomycota, Hymenochaetales). *Mycological Progress* 9(2): 225–233. doi: 10.1007/s11557-009-0628-y

Tomšovský M, 2012. Delimitation of an almost forgotten species *Spongipellis litschaueri* (Polyporales, Basidiomycota) and its taxonomic position within the genus. *Mycological Progress* 11(2): 415–424. doi: 10.1007/s11557-011-0756-z

Zhao CL, Cui BK, 2014. Phylogeny and taxonomy of *Ceriporiopsis* (Polyporales) with descriptions of two new species from southern China. *Phytotaxa* 164: 17–28. doi: 10.11646/phytotaxa.164.1.2

Zmitrovich IV, Malysheva VF, Spirin WA, 2006. A new morphological arrangement of the Polyporales. I. Phanerochaetineae. *Mycena* 6:4-56

CAPÍTULO III

- Artigo a ser submetido para o periódico Persoonia -

Studies in Neotropical *Junghuhnia* s.l. (Polyporales, Basidiomycota): description of a new genus and two new species

Mauro C. Westphalen¹ *, Mario Rajchenberg², Michal Tomšovský³ & Adriana M. Gugliotta¹

¹ Núcleo de Pesquisa em Micologia, Instituto de Botânica, Av. Miguel Estefano 3687, 04301-90, São Paulo, SP, Brazil. *Corresponding author: maurowestphalen@yahoo.com.br

² Área de Protección Forestal, Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico, C.C. 14, 9200 Esquel, Chubut, Argentina

³ Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 3, CZ-61300, Czech Republic

Abstract

Junghuhnia is a genus of polypores traditionally characterized by a dimitic hyphal system with clamped generative hyphae and presence of encrusted skeletocystidia. However, recent molecular studies revealed that *Junghuhnia* is polyphyletic and most of the species are conspecific to *Steccherinum*, a morphologically similar genus separated only by a hydroid hymenophore. In the Neotropics, very little is known on the evolutionary relations of *Junghuhnia* s.l. taxa and very few species have been included in molecular studies. In order to clarify this situation and find the proper phylogenetic placement of Neotropical species of this group, morphological and molecular analyses were carried out. Specimens were collected in Brazil and used for DNA sequence analyses of internal transcribed spacer and large subunit of ribosomal RNA gene, translation elongation factor 1-alpha gene and the second largest subunit of RNA polymerase II gene. Herbarium collections, including type specimens, were studied for morphological comparison and to confirm the identity of collections. Molecular data obtained revealed that the studied species are placed in three different genera. Specimens of *Junghuhnia carneola* represent two distinct species that group in a lineage within the phlebioid clade, separated from *Junghuhnia* and *Steccherinum*, that belong to the residual polyporoid clade. Therefore, the new genus *Cordiana* is proposed including two species, *C. carneola* (type species) and *C. davidii*. Neotropical specimens identified as *Junghuhnia nitida* represent a different lineage from the European species and are described as *Steccherinum neonitidum*. In addition, the new combinations *Flaviporus minutus*, *Steccherinum meridionalis*, *Steccherinum polycystidiferum* and *Steccherinum undigerum* are proposed.

Key words: Mycodiversity, taxonomy, phylogeny, Steccherinaceae

Introduction

The genus *Junghuhnia* Corda (Basidiomycota, Polyporales) is characterized by a dimitic hyphal system, clamped generative hyphae, small basidiospores with variable shape and presence of large encrusted skeletocystidia. Traditionally, it has been separated from *Steccherinum* Gray only by the hymenophore configuration (poroid in *Junghuhnia* and hydroid in *Steccherinum*), but microscopically both genera present almost identical features. *Antrodiella* Ryvarden & I. Johans. is also related but distinguished by the lack of cystidia (Ryvarden 1991). However, recent studies including molecular data (Miettinen et al. 2012) showed that the morphological segregation of *Junghuhnia* and *Steccherinum* is not supported by molecular phylogeny. Many species treated as *Junghuhnia* group with species with hydroid hymenophore in the *Steccherinum* clade and are separated from *J. crustacea* (Jungh.) Ryvarden, the type species of *Junghuhnia*. Furthermore, there are no microscopic characters enabling delimitation between *Junghuhnia sensu stricto* (including *J. crustacea*) and *Junghuhnia sensu lato* (species included in *Steccherinum* clade) due to convergent micromorphology. Therefore, further molecular and morphological studies are required to elucidate the position of other species of *Junghuhnia*.

In the Neotropics, 11 names were previously reported in *Junghuhnia*: *J. carneola* (Bres.) Rajchenb., *J. chlamydospora* Ryvarden, *J. globospora* Iturr. & Ryvarden, *J. meridionalis* (Rajchenb.) Rajchenb., *J. minuta* I. Lindblad & Ryvarden, *J. neotropica* I. Lindblad & Ryvarden, *J. nitida* (Pers.) Ryvarden, *J. polycystidifera* (Rick) Rajchenb., *J. semisupiniformis* (Murrill) Ryvarden, *J. subundata* (Murrill) Ryvarden and *J. undigera* (Berk. & M.A. Curtis) Ryvarden (Ryvarden 1985, Lindblad & Ryvarden 1999, Ryvarden 2007, Ryvarden & Itturiaga 2010, Westphalen et al. 2012). However, molecular data of all of them are unavailable and their phylogenetic position is unknown. During a survey of polypores in Southern Brazil, seven *Junghuhnia* s.l. species were collected and studied. Morphological and molecular data obtained support the description of a new genus, two new species and four new combinations. Full descriptions and illustrations of the new species, comments on the newly combined species and identification keys are presented.

Material and Methods

Morphological analysis

Specimens were collected in Southern Brazil in Santa Catarina, São Paulo and Rio Grande do Sul States. Additional specimens of Neotropical *Junghuhnia* s.l. from BPI, FLOR, ICN, O

and *S. herbaria* (Thiers 2015), were studied for morphological revision. For micromorphology observations, hand-cut sections of the basidiomes were prepared on microscope slides with 3% KOH solution and stained with 1% aqueous phloxin. When necessary, small pieces of the basidiomes were kept in NaOH 3% solution under 60 °C for about 12h in order to obtain a better separation of the hyphae and interpret the hyphal system. The samples were then used for preparing microscope slides. All microscopic structures observed were measured with aid of an eyepiece micrometer and, when possible, a minimum of twenty measurements of each structure were taken. The abbreviations and codes used for the measurements are: $Lm \times Wm$ = means of length and width, Q = range of length/width ratios, Qm = length/width mean, and $n = x/y$ (x = number of measurements from a given number (y) of specimens). Drawings of the microstructures were made with the aid of a drawing tube. Cresyl violet was used for observation on metachromatic reactions.

Culture obtention and biological analysis

Sporeprients were obtained from fresh basidiomes and used to prepare monosporic and polysporic cultures. Cultures were grown and kept in malt extract agar (MEA) or potato dextrose agar (PDA) at 25 °C. In order to verify the sexual polarity of species, mating system tests were performed according to Hallenbeg (1984). At least ten monosporic cultures of each species were used for mating tests. For nuclear behaviour verification, Giemsa stain was used for nuclear staining technique following Boidin (1958). After staining, the mycelia were observed under microscope and nuclear behaviour was classified as Normal, Astatocoenocytic, Heterocytic or Holocoenocytic (Boidin 1971).

DNA extraction and amplification

DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) and Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO) were used for DNA extraction from cultures and basidiomes, respectively. In cases where basidiome extraction was not successful, the 10 first steps of DNeasy Plant Minit Kit were followed and DNA extraction of the samples proceeded using magnetic-bead technology of MagNA Pure compact system (Roche). When necessary, DNA was purified using DNA Clean & Concentration Kit (Zymo Research). DNA amplification of the internal transcribed spacer (ITS) and large subunit (LSU) regions of ribosomal RNA gene were performed using ITS5/ITS4-Basidio (Nikolcheva and Bärlocher 2004) primer combination for ITS and LR0R/LR6 for LSU. The PCR regimes followed Tomšovský et al. (2010a). For translation elongation factor 1-alpha gene (*tef1*; primers: 983F/2218R), touchdown PCR with gradually

reduced annealing temperature (60–50°C) was performed (Rehner & Buckley 2005). For the second largest subunit of RNA polymerase II gene (RPB2; primers fRPB25F/bRPB271R), a touch-down protocol modified from Rehner & Buckley (2005) EF- α protocol was performed. In some samples where PCR did not present good results, a nested PCR was performed according to Tomšovský et al. (2010b). Amplification products were sent for purification and sequencing in MacroGen Ltd. (Korea).

Phylogenetic analysis

The sequences obtained were initially aligned and edited in the BioEdit software (Hall 1999) and adjusted manually. Reference sequences were chosen based on Miettinen et al. (2012), Floudas & Hibbett (2015), Binder et al. (2013) and through BLAST searches in the NCBI (National Center for Biotechnology <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and are summarized in Table 1. Two dataset of DNA sequences were prepared, using ITS-LSU and combined dataset with four molecular markers (ITS-LSU-tef1-RPB2). The datasets were aligned using MAFFT version 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) and used for the construction of phylogenetic trees applying Bayesian inference in the MrBayes 3.2.2 software (Ronquist et al. 2012). The Bayesian analyses were run for 5 million generations, sampling every 500 generations. Burnin was set to 10% of the trees. For ITS-LSU dataset additionally Maximum Likelihood analysis was conducted in PhyML (Guindon & Gascuel 2003). The evolutionary models were inferred with the jModelTest 2.c1.4 (Darriba et al. 2012) and the best fit model for both datasets was GTR + I + G.

Table 1. List of sequences used in this study. * Sequences obtained in this study

Specimen	GenBank No.			
	ITS	LSU	tef1- α	rbp2
<i>Antrodia serialis</i> (KHL 12010)	JX109844	JX109844	JX109898	JX109870
<i>Antrodiella americana</i> (KHL 11949)	JN710509	JN710509	JN710711	
<i>Antrodiella dentipora</i> (LR 40822)	JN710512	JN710512		
<i>Antrodiella duracina</i> (LR 43589)	JN710513	JN710513		
<i>Antrodiella faginea</i> (KHL 11977)	JN710514	JN710514	JN710712	
<i>Antrodiella formosana</i> (TFRI 652)	EU232184	EU232268		
<i>Antrodiella ichnusana</i> (RS 13892)	JN710516	JN710516		

<i>Antrodiella onychoides</i> (OM 2312)	JN710517	JN710517	
<i>Antrodiella pallescens</i> (X1080)	JN710518	JN710518	
<i>Antrodiella romellii</i> (OM 7429)	JN710520	JN710520	
<i>Antrodiella semisupina</i> (JL 372)	JN710521	JN710521	
<i>Aurantioporus alborubescens</i> (BRNU 627479)	JQ821319	JQ821318	
<i>Aurantioporus fissilis</i> (BRNM 699803)	HQ728292	HQ729002	
<i>Bjerkandera adusta</i> BRNM 771948	KT305935	KT305935	KT305938
<i>Bjerkandera fumosa</i> BRNM 771947	KT305937	KT305937	
<i>Byssomerulius corium</i> (FP-102382)	KP135007	KP135230	KP134921
<i>Ceriporia viridans</i> (KHL 8765)	AF347109	AF347109	
<i>Ceriporiopsis gilvescens</i> (TN 5516)	HQ659222	HQ659222	
<i>Cordiana carneola*</i> (MCW 388/12)			
<i>Cordiana carneola*</i> (MCW 474/13)			
<i>Cordiana davidii*</i> (MCW 370/12)			
<i>Cordiana davidii*</i> (MCW 396/12)			
<i>Flaviporus brownii</i> (TL 9883)	JN710537	JN710537	
<i>Flaviporus brownii</i> (X462)	JN710538	JN710538	
<i>Flaviporus brownii*</i> (MCW 362/12)			
<i>Flaviporus liebmannii</i> (LR 44553)	JN710540	JN710540	
<i>Flaviporus minutus*</i> (MCW 442/13)			
<i>Flaviporus minutus*</i> (MCW 386/12)			
<i>Flaviporus minutus*</i> (MCW 356/12)			
<i>Flaviporus subundatus*</i> (MCW 367/12)			
<i>Flaviporus subundatus*</i> (MCW 457/13)			
<i>Flaviporus subundatus*</i> (RP 332)			
<i>Flaviporus</i> sp. (PO 60302006)	JN710542	JN710542	
<i>Frantisekia mentschulensis</i> (AH 1377)	JN710544	JN710544	
<i>Gloeporus dichrous</i>	EU546097	FJ496709	

(BRNM 709971)				
<i>Gleoporus taxicola</i> (SK 0075)	JX109847	JX109847	JX109901	JX109873
<i>Hyphodermella corrugata</i> (KHL 3663)	EU118630	EU118630		
<i>Irpex lacteus</i> (DO 421/951208)	JX109852	JX109852	JX109911	JX109882
<i>Junghuhnia autumnale</i> (VS 2957)	JN710549	JN710549	JN710716	
<i>Junghuhnia collabens</i> (KHL 11848)	JN710552	JN710552	JN710717	
<i>Junghuhnia crustacea</i> (OM 13852)	JN710554	JN710554		
<i>Junghuhnia crustacea</i> (OM 2954)	JN710553	JN710553		
<i>Junghuhnia fimbriatella</i> (OM 2091)	JN710555	JN710555		
<i>Junghuhnia japonica</i> (MN 1065)	JN710556	JN710556	JN710718	
<i>Junghuhnia lacera</i> (TN 8246)	JN710557	JN710557		
<i>Junghuhnia luteoalba</i> (KHL 13238b)	JN710558	JN710558	JN710719	
<i>Junghuhnia micropora</i> (VS 2652)	JN710559	JN710559	JN710720	
<i>Junghuhnia nitida</i> (FP-105195)	KP135323	KP135227		KP134964
<i>Junghuhnia nitida</i> (KHL 11903)	JN710560	JN710560	JN710721	
<i>Junghuhnia nitida*</i> (MT 33/12)				
<i>Junghuhnia pseudozilingiana</i> (MK 1004)	JN710561	JN710561	JN710722	
<i>Junghuhnia rhinocephala</i> (X460)	JN710562	JN710562		
<i>Junghuhnia</i> sp1 (OM 12860)	JN710563	JN710563	JN710723	
<i>Junghuhnia</i> sp3 (OM 8625)	JN710564	JN710564	JN710724	
<i>Junghuhnia</i> sp4 (X1362)	JN710565	JN710565	JN710725	
<i>Junghuhnia</i> sp5 (OM 13865)	JN710566	JN710566	JN710726	
<i>Mycoacia fuscoatra</i> (KHL 13275)	JN649352	JN649352	JX109908	JX109879
<i>Mycoacia nothofagi</i> (KHL 13750)	GU480000	GU480000		
<i>Nigroporus vinosus</i> (BHS2008-100)	JX109857	JX109857		
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (BKM-F-1767)	HQ188436	GQ470643	HQ188379	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (HHB-6251)	KP135094	KP135246		KP134954
<i>Phanerochaete sordida</i> (KHL 12054)	EU118653	EU118653		

<i>Phlebia chrysocreas</i> (HHB-6333)	KP135358	KP135263		KP134908
<i>Phlebia uda</i> (FP-101544)	KP135361	KP135232		KP134909
<i>Phlebia nitidula</i> (N 020830)	EU118655	EU118655		
<i>Phlebia radiata</i> (FPL 6140)	AY854087	AF287885	AY885156	AY218502
<i>Phlebioporia bubalina</i> (YCD 13168)	KC782526	KC782528		
<i>Rhizochaete radicata</i> (FD-123)	KP135407	KP135279		KP134937
<i>Rhizochaete brunnea</i> (MR 11455)	AY219389	AY219389		
<i>Scopuloides hydroides</i> (KHL 11916)	EU118665	EU118665		
<i>Scopuloides rimosa</i> (HHB-7042)	KP135350	KP135282		KP134903
<i>Skeletocutis nivea</i> (ES2008-1)	JX109858	JX109858		
<i>Spongipellis spumeus</i> (BRNM 712630)	HQ728288	HQ728288		
<i>Spongipellis pachyodon</i> (AFTOL-ID 705)	DQ249277	AY629322	DQ028599	DQ408123
<i>Steccherinum meridionalis*</i> (MR 284)				
<i>Steccherinum meridionalis*</i> (MR 11086)				
<i>Steccherinum meridionalis*</i> (MR 10466)				
<i>Steccherinum bourdotii</i> (RS 10195)	JN710584	JN710584		
<i>Steccherinum fimbriatum</i> (KHL 11905)	JN710530	JN710530		
<i>Steccherinum neonitidum*</i> (MCW 371/12)				
<i>Steccherinum neonitidum*</i> (RP 79)				
<i>Steccherinum ochraceum</i> (KHL 11902)	JN710590	JN710590	JN710730	JN710738
<i>Steccherinum polycystidiferum*</i> (MCW 419/12)				
<i>Steccherinum polycystidiferum*</i> (RP 140)				
<i>Steccherinum robustius</i> (G 1195)	JN710591	JN710591		
<i>Steccherinum tenue</i> (KHL 12316)	JN710598	JN710598	JN710733	
<i>Steccherinum tenuispinum</i> (OM 8065)	JN710599	JN710599		
<i>Steccherinum tenuispinum</i> (LE 231603)	KM411452	KM411452		
<i>Steccherinum tenuispinum</i> (VS 2116)	JN710600	JN710600		
<i>Steccherinum undigerum*</i>				

(MCW 426/13)				
<i>Steccherinum undigerum</i> *				
(MCW 472/13)				
<i>Steccherinum undigerum</i> *				
(MCW 496/14)				
<i>Steccherinum</i> sp1	JN710592	JN710592	JN710731	
(OM 13705)				
<i>Steccherinum</i> sp2	JN710593	JN710593		
(OM 9300)				
<i>Steccherinum</i> sp3	JN710594	JN710594	JN710732	
(OM 14391)				
<i>Steccherinum</i> sp4	JN710596	JN710596		
(OM 13755)				
<i>Trametopsis cervina</i>	JN165020	JN164796	JN164882	JN164877
(TJV 93216T)				

Results

Molecular data obtained show that the studied Neotropical *Junghuhnia* spp. are polyphyletic and occur in three different genera (Figs. 1 and 2): *Steccherinum*, *Flaviporus* and a new genus in the Phlebioid clade. None of studies species is related to the generic type, *J. crustacea*. The description of a new polypore genus in the Phlebioid clade, *Cordiana*, including *J. carneola*, is supported by both the phylogenetic data and morphological characters. Moreover, *J. carneola* is in fact a complex of two species. Our data also show that the Neotropical *J. nitida* represents a different species separated from the European specimens (the species was described from Europe) and here is described as a new species, *Steccherinum neonitidum*. In addition, four new combinations: *Flaviporus minutus*, *Steccherinum merdidionalis*, *Steccherinum polycystidiferum* and *Steccherinum undigerum*, are proposed and the position of *J. subundata* in *Flaviporus* Murrill (Ginns 1980) is confirmed. Full descriptions and illustrations of the new genus and the two new species are presented below, as well as comments on the new combinations proposed. Identification keys for the genera and species of Neotropical *Junghuhnia* s.l. are also provided. Further discussion on the four Neotropical species not included in this study (*J. chlamydospora*, *J. globospora*, *J. neotropica* and *J. semisupiniformis*) is presented.

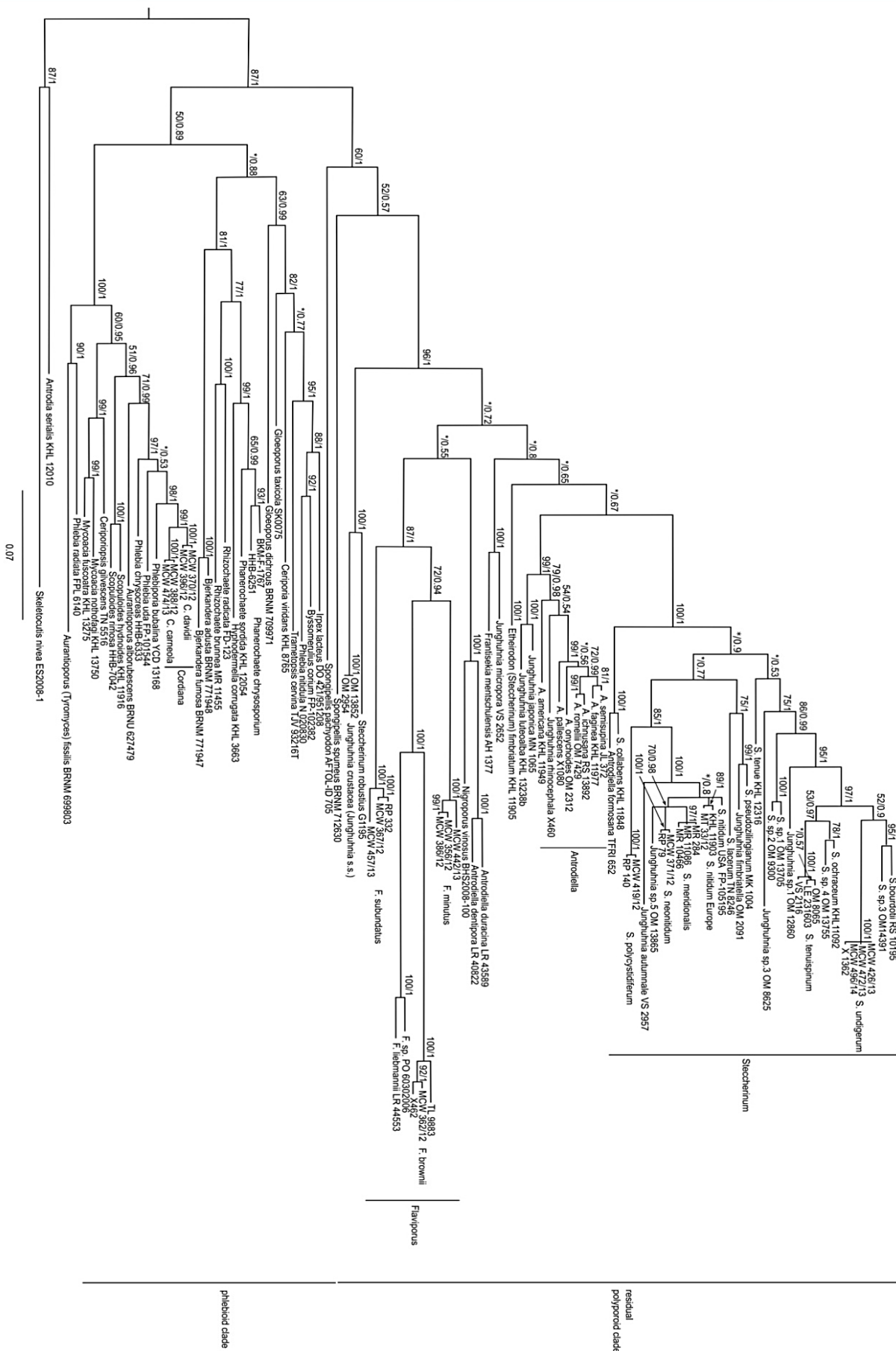


Fig 1. Phylogenetic tree of ITS-LSU region conducted by Bayesian analysis (for legends to numbers, see Table 1). Numbers at branches indicate maximum likelihood bootstrap proportion and Bayesian posterior probability values. The asterisk (*) marks different topology in both analyses. The bar indicates number of expected substitutions per position.

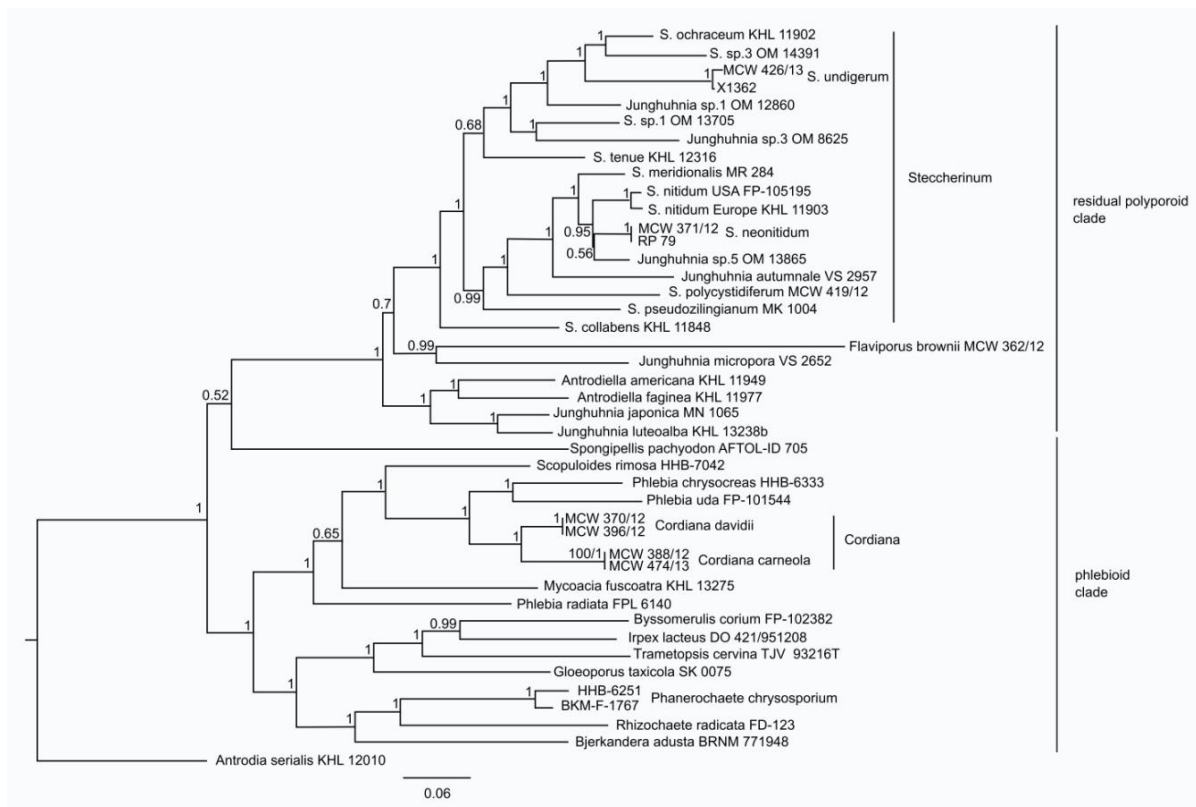


Fig 2. The phylogenetic tree of ITS-LSU-tef1-rpb2 region conducted by Bayesian analysis (for legends to numbers see Table 1). Numbers at branches indicate Bayesian posterior probability values. The bar indicates number of expected substitutions per position.

Taxonomy

Cordiana Westphalen, Tomšovský & Rajchenb. *genus novum*

Diagnosis: *Cordiana* is characterized by the basidiomes becoming reddish when bruised, the abundant, long, thin- to thick-walled, finely incrustated cystidia and the metachromatic skeletal hyphae and cystida.

Etymology: Named in honor of August C. J. Corda (Prague, 1809-1849), who described the genus *Junghuhnia*.

Type species: *Cordiana carneola* (Bres.) Westphalen & Rajchenb.

Description: Basidiomes resupinate, adnate, becoming reddish when bruised and/or upon drying, soft to fleshy when fresh, becoming harder and somewhat waxy when dried. Hymenophore poroid; pores regular to irregular, round to angular. Hyphal system dimitic, generative hyphae clamped, skeletal hyphae metachromatic, hyphae IKI-. Cystidia present in the trama and dissepiments, cylindrical to clavate, incrustated at the apex with thin crystals,

usually very long and appearing as skeletal hyphae ends, metachromatic, IKI-. Basidiospores ellipsoid to sub-cylindrical, hyaline, smooth, IKI-

Comments: *Cordiana* is characterized by resupinate, somewhat fleshy basidiomes typically becoming reddish when bruised or dried. The colour change is variable, and in some basidiomes only some reddish spots appear while others become pale reddish brown to flesh coloured throughout. Microscopically, the very long finely incrustated cystidia are typical. In the trama, the cystidia are usually markedly thick-walled and long, arising from skeletal hyphae that slowly increase in diameter. For that reason, the distinction between skeletal hyphae and cystidia sometimes is not clear and the cystidia may be interpreted as wide incrustated skeletal hyphae ends. Here we choose to use the term cystidia as these structures can be very conspicuous in the dissepiments and in the trama, sometimes having many crystals covering a widened apex. In addition, the skeletal hyphae and cystidia are metachromatic, while the generative hyphae, hymenium and basidiospores are negative in Cresyl Violet. *Cordiana* differs from other polypore genera exactly by this combination of characteristics, which is unique and unknown in other poroid fungi. Even though the type species had been placed in *Junghuhnia*, morphological, biological and molecular data support it as a different genus. *Junghuhnia* s.s. and *Steccherinum* present long incrustated skeletocystidia. However, in both genera the cystidia are incrustated with large crystals and can be easily distinguished from the skeletal hyphae, as they present a more abrupt widening and more evident incrustation. In addition, the skeletal hyphae in *Junghuhnia* and *Steccherinum* are negative in Cresyl Violet and only the cystidia present a variable metachromatic reaction, while in *Cordiana* the cystidia and skeletal hyphae are metachromatic throughout. Furthermore, culture studies had already shown that *C. carneola* is bipolar and astatocoenocytic, while species of *Junghuhnia* s.s. and *Steccherinum* s.l. are tetrapolar and have a normal nuclear behaviour (David & Rajchenberg 1985, Rajchenberg 2011). The combination of bipolarity and astatocoenocyty is characteristic in the Phlebioid clade (Rajchenberg 2011), and our molecular data confirm the position of *Cordiana* in that group (Fig. 1). Phylogenetically, the closest related polypore species known is *Phlebioporia bubalina* (Chen & Cui 2014) but, morphologically, it substantially differs by presenting a monomitic hyphal system with simple septate dextrinoid hyphae and lack of cystidia.

Cordiana carneola (Bres.) Westphalen & Rajchenb. *combination novum*

Fig. 3–4

≡ *Poria carneola* Bres., Hedwigia 35: 282 (1896), basionym

≡ *Junghuhnia carneola* (Bres.) Rajchenb., Revta. Investnes. agrop.: 45 (1984)

Comments: This species was described from Southern Brazil (Santa Catarina State) by Bresadola (1896) and since then registered from different Neotropical and subtropical regions in South and Central America (Lowe 1966, Carranza-Velásquez & Ruiz-Boyer 2005, Robledo & Rajchenberg 2007, Westphalen et al. 2012). It is characterized by the yellowish basidiomes that become reddish when bruised and sometimes after drying, the large and very irregular pores (3–5/mm) that are often splitted and lacerate, forming a daedaloid surface. Microscopically it presents dimitic hyphal system, thin to thick-walled cystidia incrustated with fine crystals and narrowly ellipsoid basidiospores ($4.0\text{--}5.0 \times 2.0\text{--}2.5 \mu\text{m}$, $L_m \times W_m = 4.38 \times 2.38$, $Q = 1.60\text{--}2.25$, $Q_m = 1.86$, $n = 30/2$).

Examined specimens: BRAZIL. Paraná: Paranaguá, Prox. a Rodovia PR 508, 02.IX.2013, M.C. Westphalen 458/13 (SP 446225). Rio Grande do Sul: São Francisco de Paula, FLONA, 30.IV.2012, M.C. Westphalen 388/12 (SP 446186). Santa Catarina: Blumenau, Moller (S F159730, syntype); ibid. Moller 284 (S F15834, syntype); ibid. Moller 465 (S F15836, syntype); Itapoá, RPPN Volta Velha, 17.XI.2012, M.C. Westphalen 412/12 (FLOR); Santo Amaro de Imperatriz, Parque Estadual da Serra do Tabuleiro, Hotel Plaza Caldas da Imperatriz, 24.I.2014, M.C. Westphalen 480/14 (SP 446238). São Paulo: Santo André, Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, 05.XII.2013, M.C. Westphalen 474/13 (SP 446234); São Luiz do Paraitinga, P.E. da Serra do Mar, Núcleo Sta. Virgínea, 17.IV.2013, R.M. Pires RP2 (SP 446259).

Cordiana davidii Westphalen & Rajchenb. *species novum*

Figs. 3–4

Holotype: BRAZIL. Rio Grande do Sul: Morrinhos do Sul, Perdida, 14.V.2012, M.C. Westphalen 396/12 (SP 446193).

Etymology: named in honor of Alix David (Lyon, France), for her extensive work on the biology of fungi, especially her numerous investigations on the mating systems and nuclear behavior of polypores.

Basidiomes annual, resupinate, thin, soft and somewhat fleshy when fresh, becoming hard and slightly waxy when dried, margin narrow to absent, regular, white to cream-colored; pore surface pale yellow to pale greenish-yellow when fresh, becoming reddish when bruised and straw-coloured to pinkish-brown after drying; pores regular, round to angular, with thin and often dentate dissepiments, sometimes partially splitted, 5–7(8) per mm, tubes concolor with

the pore surface, up to 2 mm deep; subiculum very thin, up to 0.2 mm thick, cream-colored when fresh, becoming ochraceous when dried.

Hyphal system dimitic; generative hyphae with clamps, branched or more rarely unbranched, hyaline and thin-walled, 2.0–4.0 μm wide; skeletal hyphae hyaline to slightly yellowish, thick-walled to almost solid, unbranched, 3.0–5.0 μm wide. Cystidia appearing as thickened skeletal hyphal ends, in the dissepiments slightly thick-walled, in the trama forming a continuous with the skeletal hyphae with very thick walls to almost solid, but usually with a wider lumen at the apex, finely incrustated, 5.0–8.0 μm diam. Cystidioles fusoid to ventricose, 9–11 \times 4–4.5 μm . Basidia clavate, 4-sterigmate, 10–12 \times 4–5 μm ; basidiospores ellipsoid, hyaline, smooth, thin-walled, usually with one or two oil drops, 3.5–4.5 \times 2.0–3.0 μm , $L_m \times W_m = 4.02 \times 2.60$, $Q = 1.33 - 1.80$, $Q_m = 1.55$, $n = 30/1$.

Comments: *Cordiana davidii* is characterized by the yellowish basidiomes that become reddish when bruised and after drying, the medium to small pores and the small ellipsoid basidiospores. It differs from *C. carneola* in smaller and more regular pores, sometimes only partially splitted (Fig. 3c-d). In addition, *C. carneola* presents slightly longer and thinner, narrowly ellipsoid spores. Even though there are cases of overlapping in basidiospore size between the two species and only a detailed examination can reveal the differences, the values of Q and Q_m show the difference in spore shape.

Examined specimens: BRAZIL. Rio Grande do Sul: São Francisco de Paula, CPCN Pró-Mata, 14.XI.2009, M.C. Westphalen 289/09 (ICN 154468); *ibid.*, 18.IV.2012, M.C. Westphalen 370/12 (SP 446173).

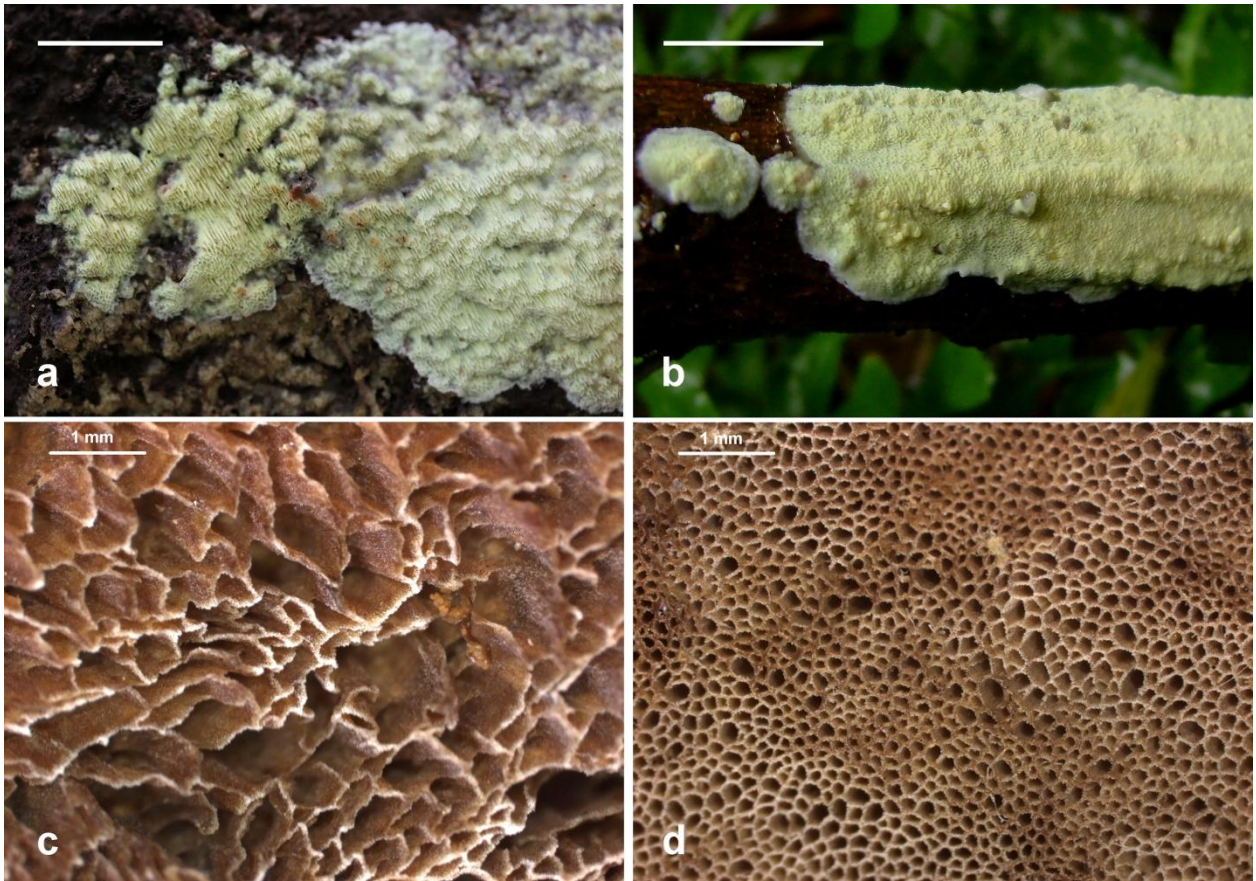


Fig 3. *Cordiana carneola* (a and c) and *C. davidii* (b and d). **a-b.** Fresh basidiomes (scale bars = 2 cm). **c-d.** Detail of pore surface in dried basidiomes (scale bars = 1 mm). Pictures by D.L. Komura (a), M.A. Reck (b) and M.C. Westphalen (c and d).

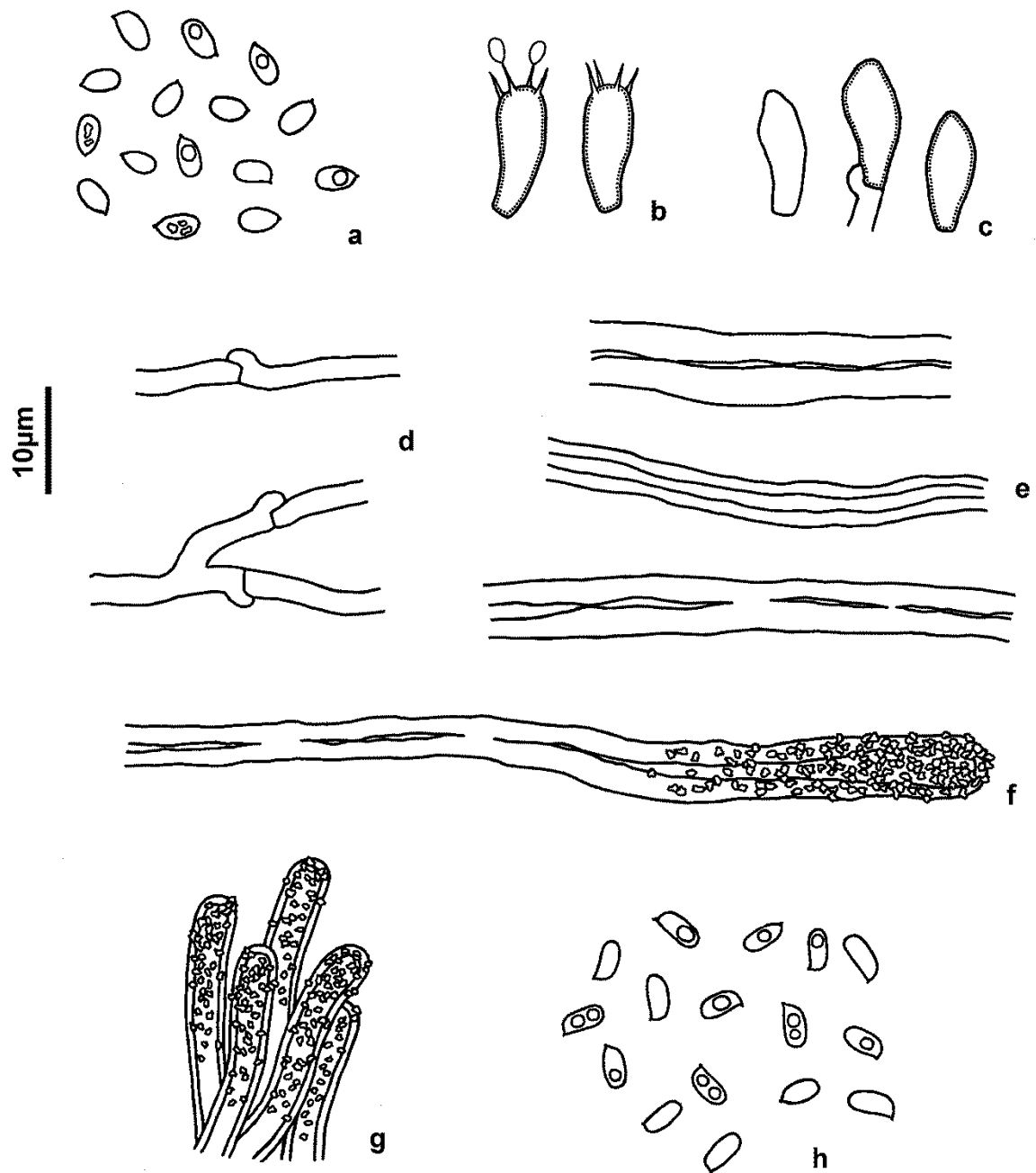


Fig 4. *Cordiana davidii* (a-g) and *C. carneola* (h). **a.** Basidiospores. **b.** Basidia. **c.** Cystidioles. **d.** Generative hyphae. **e.** Skeletal hyphae. **f.** Cystidium from the trama. **g.** Cystidia from the dissepiments. **h.** Basidiospores. Illustrations by M.C. Westphalen.

Flaviporus minutus (I. Lindblad & Ryvardeen) Westphalen, Rajchenb. & Tomšovský
combination novum

≡ *Junghuhnia minuta* I. Lindblad & Ryvardeen, Mycotaxon 71: 346 (1999), basionym

Comments: Due to the presence of strongly agglutinated hyphae, this species morphologically fits the concept of *Flaviporus*. Moreover, our molecular data confirms that it groups with *Flaviporus* (Fig.1). *Flaviporus minutus* can be easily recognized by the very small and brittle basidiomes, growing in clusters that become resinous-hard upon drying. Microscopically it is very similar to *F. brownii* (Humb.) Donk, presenting hyphal pegs and thick-walled incrusted cystidia. Macroscopically, *F. minutus* is similar to *F. liebmannii*, presenting whitish basidiomes with darkening of the pileus surface upon drying. However, *F. liebmannii* differs in solitary to imbricate larger basidiomes and microscopically it lacks incrusted thick-walled cystidia. For a full description see Westphalen et al. (2012) (as *Junghuhnia minuta*).

The hyphal system in *Flaviporus* is difficult to interpret because the hyphae are strongly agglutinated, especially in dried specimens. Our observations of *F. minutus* and *F. brownii* treated in NaOH solution showed that many thick-walled hyphae present clamps, but some long aseptate segments can also be observed. In addition, there is no clear distinction between the hyphae present, so we classify the hyphal system as monomitic to pseudo-dimitic instead of strictly dimitic, as defined by Ginns (1980).

Examined Specimens: BRAZIL. Paraná: Piraquara, Morro do Canal, 04.IX.2013, M.C. Westphalen 470/13 (SP 446231). Santa Catarina: Florianópolis, UCAD, 12.III.2012, M.C. Westphalen 356/12 (SP 446164). Rio Grande do Sul: São Francisco de Paula, FLONA, 30.IV.2012, M.C. Westphalen 386/12 (SP 446184); *ibid.* 15.IV.2013, M.C. Westphalen 427/13 (SP 446207) and 430/13 (SP 446210); *ibid.* CPCN Pró-Mata, 19.IV.2013, M.C. Westphalen 442/13 (SP 446218). ECUADOR: Orellana, Yasuni National park, Yasuni Scientific Research Station, L. Ryvardeen 44687, 9-12.Mar.2002 (O).

Steccherinum meridionalis (Rajchenb.) Westphalen, Tomšovský & Rajchenb. *combination novum*

≡ *Junghuhnia collabens* var. *meridionalis* Rajchenb., Sydowia 40: 236 (1987), basionym

≡ *Junghuhnia meridionalis* (Rajchenb.) Rajchenb., Aust. Syst. Bot. 16 (4): 477 (2003)

Comments: *Steccherinum meridionalis* is characterized by cinnamon to brick red resupinate basidiomes with small pores (7–9/mm) and waxy soft consistency when fresh, becoming hard upon drying. Microscopically, it presents abundant skeletocystidia projecting above the hymenium and sub-cylindrical basidiospores ($3.0\text{--}4.0 \times 1.5\text{--}2.0 \mu\text{m}$). This species was first described as a variety of *Junghuhnia collabens* (Rajchenberg 1987) but later, using cultural features and intercompatibility tests, Rajchenberg (2003) verified it is an autonomous taxon. Our data shows that *S. meridionalis* and *J. collabens* are not phylogenetically related (Fig. 1) and that the former groups close to the Neotropical species *S. neonitidum*. *Junghuhnia meridionalis* was described from the Patagonian Andes forests in Southern Argentina and Chile and later registered from neotropical regions (Westphalen et al. 2010, Westphalen et al. 2012). Unfortunately, the DNA amplification and sequencing of Brazilian specimens was unsuccessful, but we decided to keep the Neotropical species under the name *S. meridionalis* and include it in the identification key. Further work can clarify if the Neotropical and Patagonian specimens belong to the same widely distributed species or if the Neotropical collections represent a morphologically similar but molecularly separated species. For a full description see Westphalen et al. (2012; as *J. meridionalis*).

Examined specimens: ARGENTINA. Chubut, P.N. Los Alerces, Río Arrayanes y Menéndez, 8.V.1991, M. Rajchenberg 11086 (CIEFAP 54). Neuquén, P.N. Lanín, Lago Lácar, Cascada Chachín, 19.V.1999, M. Rajchenberg 11924 (CIEFAP 284). CHILE. Palena: Chaitén, ruta a Caleta Gonzalo, km 20, 6.IV.1996, M. Rajchenberg 10466 (CIEFAP 55). Valdivia, Corral, Thaxter, VIII.1905 (BAFC 31012, holotype; NY isotype). BRAZIL. Paraná: Morretes, Serra da Graciosa, 13.X.2009, M.A. Reck 251/09 (ICN 154709). Rio Grande do Sul: São Francisco de Paula, FLONA, 22.VI.2009, M.C. Westphalen 238/09 (ICN 154290); ibid. 26.III.2010, M.C. Westphalen 295/10 (ICN 154659); ibid., 26.III.2010, M.C. Westphalen 303/10 (ICN 154660). Derrubadas, Parque Estadual do Turvo, 15/IX/2009, M.A. Reck 198/09 (ICN 154340). Santa Catarina: Santo Amaro da Imperatriz, Parque Estadual Serra do Tabuleiro, 18/IX/2010, M.A. Reck 559/10 (ICN 154719).

Steccherinum neonitidum Westphalen & Tomšovský, *species novum*

Holotype: BRAZIL. Rio Grande do Sul: São Francisco de Paula, CPCN Pró-Mata, 18.IV.2012, M.C. Westphalen 371/12 (SP 446174).

Etymology: *Neo-* means new in Latin. The name refers to morphological similarity of the species to *Steccherinum nitidum* (Pers.) Vesterh. (syn. *Junghuhnia nitida*).

Basidiomes annual, resupinate, very thin, easily separable from the substrate and often detaching upon drying, soft when fresh, becoming corky and somewhat brittle when dried; margin irregular, white, narrow to wide, very thin, cottony and fimbriate, up to 5 mm wide; pore surface pinkish cream to very pale pinkish-cinnamon; pores regular, round to angular, sometimes partially lacerate, 8-11 per mm; tubes up to 1.0 mm deep, concolor with the pore surface; subiculum white to cream-colored, up to 0.5 mm thick.

Hyphal system dimitic; generative hyphae clamped, thin to slightly thick-walled, hyaline, 2.0–3.5 μm diam.; skeletal hyphae unbranched to branched, thick-walled to solid, hyaline to yellowish, 2.0–5.0 μm diam. Skeletocystidia, abundant, clavate, thick-walled and heavily incrustated, metachromatic, immersed in the trama or projecting above the hymenium, 6.0–10.0 μm diam. Basidia clavate, 4-sterigmate; basidiospores ovoid to ellipsoid, smooth and hyaline, 3.0–4.0 \times 2.0–3.0 μm , $L_m \times W_m = 3.35 \times 2.53 \mu\text{m}$, $Q = 1.2 - 1.5$, $Q_m = 1.34$, $n = 20/1$.

Mating system: tetrapolar. Ten monosporic cultures (SP 446174) were confronted and the mating types distributed as following:

A_1B_1 : 1, 2, 4; A_2B_2 : 6, 10; A_1B_2 : 3, 5, 8, 9; A_2B_1 : 7

Nuclear behaviour: normal (monosporic culture monokaryotic, polysporic culture dikaryotic).

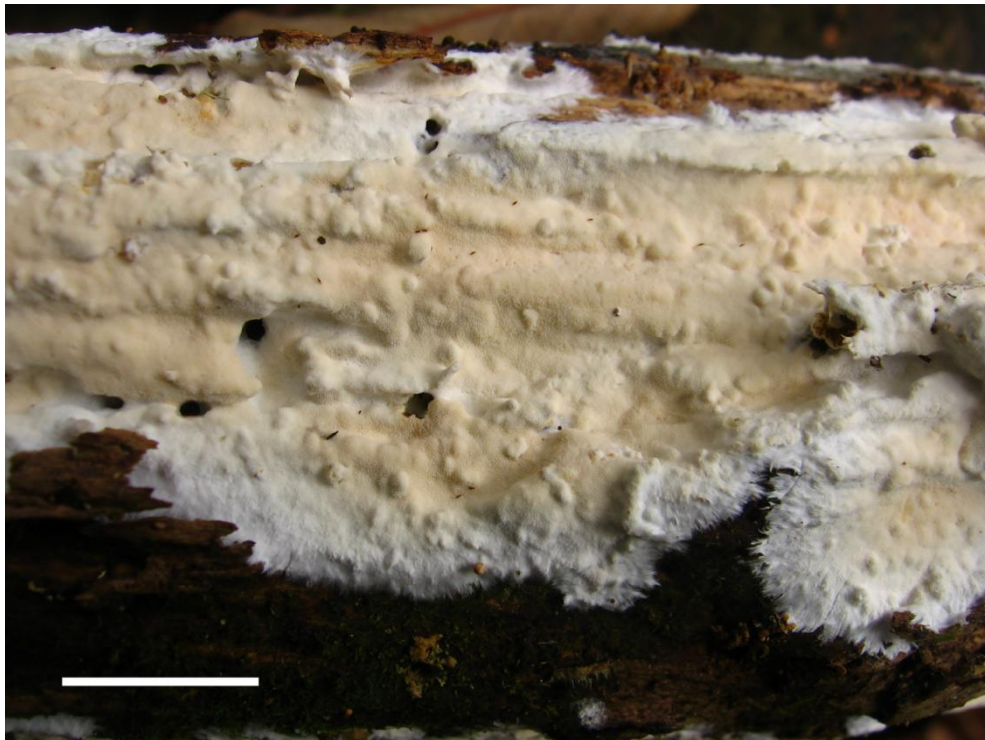


Fig 5. *Steccherinum neonitidum* (scale bar = 2 cm). Picture by M.A. Reck.

Comments: *Steccherinum neonitidum* is characterized by pinkish, thin resupinate basidiomes with small pores and fimbriate white margins. Microscopically it can be recognized by the small ovoid to ellipsoid basidiospores and the abundant incrustated skeletocystidia. This species has been traditionally identified in Brazil as *J. nitida* due to its morphological similarities. However, *Steccherinum nitidum* (= *Junghuhnia nitida*) can be distinguished by the larger pores (4-7 per mm; in margins of basidiomata pores can split to 3 per mm) and the somewhat longer basidiospores ($3.7\text{--}4.5 \times 2.0\text{--}2.7 \mu\text{m}$, $L_m \times W_m = 4.26 \times 2.41 \mu\text{m}$, $Q = 1.65 - 1.88$, $Q_m = 1.77$, $n = 187/9$). A careful analysis of herbarium specimens identified as *J. nitida* in other areas of the Neotropical region may greatly increase the distribution of this species and confirm if *S. nitidum* is restricted to temperate regions in the Northern Hemisphere, while *S. neonitidum* is distributed throughout neotropical regions. *Steccherinum meridionalis* is also morphologically similar, but can be separated by the darker, cinnamon to brick-red basidiomes and the sub-cylindrical basidiospores.

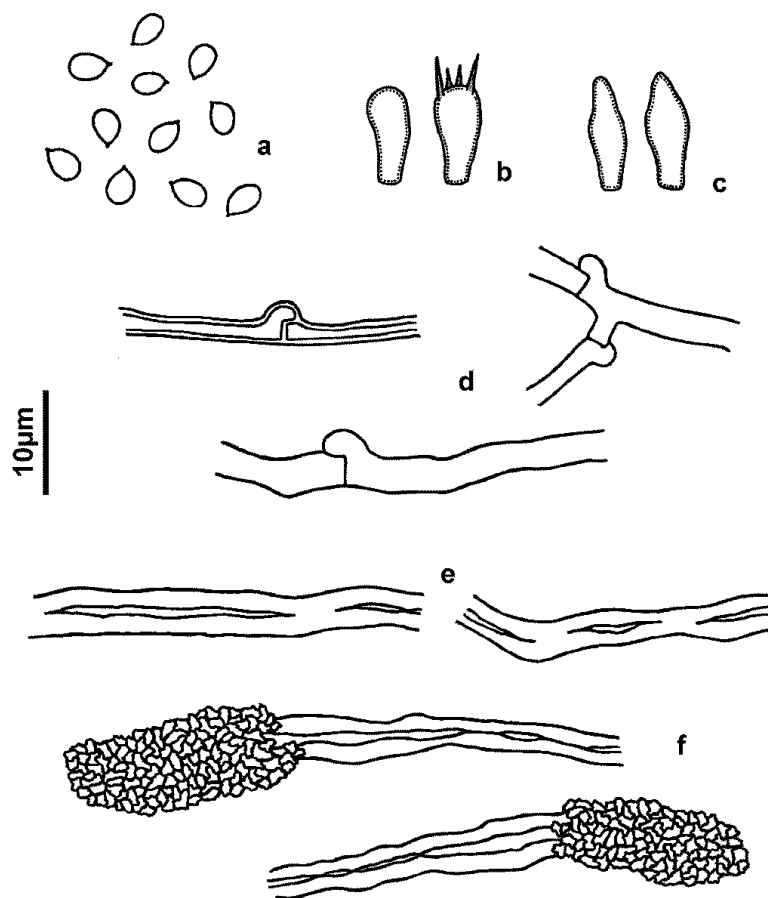


Fig 6. *Steccherinum neonitidum*. a. Basidiospores. b. Basidia. c. Cystidioles. d. Generative hyphae. e. Skeletal hyphae. f. Skeletocystidia. Illustrations by M.C. Westphalen.

Examined specimens: BRAZIL. Rio Grande do Sul: Cambará do Sul, PARNA da Serra Geral, Itaimbezinho, R.M. Silveira & R.T. Guerrero 048 19.XI.1987 (ICN); *ibid.*, Fortaleza, 29.IV.2012, M.C. Westphalen 380/12 (SP 446179); São Francisco de Paula, CPCN Pró-Mata, 30.V.2009, M.C. Westphalen 222/09 (ICN 154296); *ibid.* FLONA, 22.VI.2009, M.C. Westphalen 236/09 (ICN 154294) and M.C. Westphalen 241/09 (ICN 154295). São Paulo: São Luiz do Paraitinga, P.E. da Serra do Mar, Núcleo Sta. Virgínea, 12.VI.2013, R.M. Pires & C.M. Ishida RP79 (SP 445975).

Steccherinum polycystidiferum (Rick) Westphalen, Tomšovský & Rajchenb., *combination novum*

≡ *Poria polycystidifera* Rick, *Iheringia* 7: 281 (1960), basionym

≡ *Junghuhnia polycystidifera* (Rick) Rajchenb., *Nordic J. Bot.* 7(5): 566 (1987)

Comments: *Steccherinum polycystidiferum* is characterized by cream-colored to beige resupinate basidiomes, becoming slightly darker upon drying, small pores (6–8/mm) and ellipsoid to sub-cylindrical small basidiospores (3.0-4.0 × 1.5-2.0 μm). *Steccherinum meridionalis* presents very similar micromorphology and can be distinguished only by the cinnamon to brick-red colored basidiomes. Despite the morphological similarities, *S. polycystidiferum* presents a phylogenetic isolate position, but close to the *S. nitidum* group. This seems to be a rare species, first described from Northern Argentina as *Junghuhnia microspora* Rajchenb. (Rajchenberg 1983), and later synonymized with *J. polycystidifera* (Rajchenberg 1987), species originally described from Southern Brazil as *Poria polycystidifera* Rick (Rick 1960).

Examined specimens: BRAZIL. Rio Grande do Sul: Caxias do Sul, Terceira Léguas, 10.XII.2012, M.C. Westphalen 419/12 (SP 446201). *Ibid.*, São Salvador, 4.IV.1944, J. Rick s.n. (PACA FR 18603, holotype). *Ibid.*, Porto Alegre, Morro Santana, 14.XII.2007, M.C. Westphalen 070/07 (ICN 154122). Santa Catarina: Blumenau, Parque Nacional da Serra do Itajaí, 12.VI.2012, M.A.B. Silva et al. 253 (FLOR 49252). São Paulo: São Luiz do Paraitinga, P.E. da Serra do Mar, Núcleo Sta. Virgínea, 29.X.2013, R.M. Pires 140 (SP 446271).

Steccherinum undigerum (Berk & M.A. Curtis) Westphalen & Tomšovský, *combination novum*

≡ *Polyporus undigerus* Berk. & M.A. Curtis. Bot J Linn Soc 10: 317 (1869), basionym

≡ *Junghuhnia undigera* (Berk. & M.A. Curtis) Ryvarden, Mycotaxon 20 (2): 359 (1984)

Mating system: tetrapolar. Two specimens were studied, each with nine monosporic cultures confronted, and the mating types distributed as following:

(SP 446233) A₁B₁: 1, 2, 5, 8; A₂B₂: 4, 9; A₁B₂: 3, 6; A₂B₁: 7

(SP 446206) A₁B₁: 1, 2, 8; A₂B₂: 3; A₁B₂: 4, 6; A₂B₁: 5, 7, 9

Nuclear behaviour: normal (monosporic culture monokaryotic, polysporic culture dikaryotic).

Comments: *Steccherinum undigerum* is characterized by pileate, thin and flexible effused-reflexed or more rarely sessile basidiomes that become corky and somewhat brittle upon drying. Even though it presents a poroid hymenohpore, the pores (5–6/mm) present dentate dissepiments and are often splitted and somewhat irregular. The features of the pore surface is what distinguishes this species from others in the *Steccherinum* clade. Microscopically, it presents the typical skeletocystidia of *Steccherinum*, more easily observed in the dissepiments edges but also found in the trama, dimitic hyphal system and ellipsoid to subglobose basidiospores (4.5–5 × 3.5–4.5 μm), larger than other species of the group. For a full description see Westphalen et al. (2012) (as *J. undigera*). Phylogenetically, *S. undigerum* is the only species studied that groups very close to *S. ochraceum* (Pers.) Gray (Fig. 1 and 2), type species of the genus (for further comments see Discussion). Our materials present identical ITS and LSU sequences to a specimen from Cuba, type locality of this species, available at GenBank as *Junghuhnia* sp. 4. (Miettinen et al. 2012). *Steccherinum undigerum* is a very common species in Southern Brazil and is often found in different areas of the Atlantic Rainforest.

Examined Specimens: BRAZIL. Paraná: Curitiba, Parque Barigui, 26.I.2014, M.C. Westphalen 485/14 (SP 446242). Rio Grande do Sul: São Francisco de Paula, CPCN Pró-Mata, 18.IV.2012, M.C. Westphalen 374/12 (SP 446176); *ibid.*, 19.IV.2013, M.C. Westphalen 443/13 (SP 446219); FLONA, 30.IV.2012, M.C. Westphalen 387/12 (SP 446185); Dom Pedro de Alcântara, Mata da Cova Funda, 14.V.2012, M.C. Westphalen 392/12 (SP 446189); Morrinhos do Sul, Perdida, 14.V.2012, M.C. Westphalen 395/12 (SP 446192); Caxias do Sul, Terceira Légua, 10.XII.2012, M.C. Westphalen 418/12 (SP 446200). São Paulo: Santo André, P.E. do Alto da Serra de Paranapiacaba, 05.XII.2013, M.C. Westphalen 472/13 (SP 446233); São Luiz do Paraitinga, PE da Serra do Mar, Núcleo Santa

Virgínea, Trilha Ipiranga, 07.XI.2012, M.C. Westphalen 406/12 (SP 446199); *ibid.*, 26.IV.2014, M.C. Westphalen & R.M. Pires 496/14 (SP 446249); *ibid.*, 27.IV.2014, M.C. Westphalen & R.M. Pires 501/14 (SP 446254); São Paulo, P.E. Fontes do Ipiranga, 20.V.2013, M.C. Westphalen 426/13 (SP 446206); *ibid.*, P.E. da Cantareira 20.VI.2013, M.C. Westphalen 446/13 (SP 446221). CUBA: sine loc., C. Wright 457 (K holotype).

Additional examined specimens: *Flaviporus subundatus* – BRAZIL. Paraná: Paranaguá, Prox. a Rodovia PR 508, 02.IX.2013, M.C. Westphalen 457/13; Curitiba, Parque Barigui, 26.I.2014, M.C. Westphalen 483/14. Rio Grande do Sul: São Francisco de Paula, FLONA, 16.IV.2012, M.C. Westphalen 367/12; *ibid.*, 30.IV.2012, M.C. Westphalen 381/12; *ibid.* 15.IV.2013, M.C. Westphalen 445/13. Santa Catarina: Itapoá, RPPN Volta Velha, 17.XI.2012, M.C. Westphalen 411/12 (FLOR). São Paulo: São Paulo, Parque Estadual da Cantareira, 27.VI.2012, M.C. Westphalen 398/12; P.E. da Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínea, 27.IV.2014., R.M. Pires RP332 (SP 446276). Peruíbe, Estação Ecológica Juréia-Itatins, 25.III.2014, M.C. Westphalen 494/14. CUBA. Guantánamo: Baracoa, El Yunque Mountain, III.1903, L.M. Underwood & F.S. Earle 1168 (BPI US0243504 Isotype). *Steccherinum nitidum* – GERMANY. Rhineland, Bonn, Bad Godesberg, Alnus glutinosa, 8.II.1968, leg. H. Gorholt (PRM 690499). AUSTRIA. Styria, Graz, Grazer Bergland, Schöckel Mountain, 31.IX.1975, leg. P. Döbbeler and J. Poelt (PRM 801862). CZECH REPUBLIC. Brno, Žebětín, 30.X.2015, M. Tomšovský 52/2015. Znojmo, Vranov nad Dyjí, Braitava nature monument, 29.VIII.2012, M. Tomšovský 33/2012. SLOVAKIA. Zvolen, Hriňová, *Fagus sylvatica*, 28.VIII.1982, leg. F. Kotlaba, (PRM 828459. Hajnáčka, Pohanský hrad nature reserve, *Quercus* sp., 22.VII.1993, leg. J. Holec (PRM 886250). Humenné, Svetlice, *Fagus sylvatica*, 23.X.1987, leg. F. Kotlaba (PRM 854505). HUNGARY, Tapolca, Lesence valley, *Carpinus betulus*, 15.IX.1978, leg. V. Holubová (PRM 818395). Mátra Mts., Kékes Mt., *Fagus sylvatica*, 22.IX.1978, leg. J. Klán (PRM 818365).

Key to Neotropical *Junghuhnia* s.l. genera

1. Basidiomes becoming reddish or blackish when bruised and/or after drying, appearing as elongated finely incrustated skeletal hyphae ends and sometimes hard to differentiate from them, skeletal hyphae metachromatic *Cordiana*
1. Basidiomes not changing colour when bruised, sometimes darker after drying, cystidia easily distinguished from the skeletal hyphae, smooth or covered with large crystals, skeletal hyphae non metachromatic 2
2. Basidiomes strongly shrinking when dried, resinous-hard, cystidia variable, thin to thick-walled, smooth or heavily incrustated, hyphae strongly agglutinated, hyphal system pseudo-dimitic *Flaviporus*
2. Basidiomes with no remarkable shrinking when dried, corky to waxy, cystidia thick-walled and heavily incrustated, hyphae not agglutinated, hyphal system strictly dimitic *Stecherinum* and *Junghuhnia* s.s.

Key to Neotropical *Junghuhnia* s.l. species

1. Basidiomes strictly resupinate 2
1. Basidiomes pileate, effused-reflexed to sessile 9
2. Basidiomes changing colour when bruised or dried, cystidia finely incrustated, skeletal hyphae metachromatic 3
2. Basidiomes with no remarkable color change when bruised or dried, cystidia smooth or heavily incrustated 5
3. Basidiomes becoming blackish in parts when dried, dextrinoid chlamydospores present *J. chlamydospora*
3. Basidiomes becoming reddish when bruised and often when dried, dextrinoid chlamydospores absent 4
4. Pore surface irregular, pores 3–5/mm, strongly splitted, basidiospores narrowly ellipsoid *C. carneola*
4. Pore surface regular, pores 5–8/mm, entire or only slightly splitted, basidiospores ellipsoid *C. davidii*
5. Generative hyphae simple-septate, hyphae strongly agglutinated, cystidia hard to observe and sometimes only large crystals seen in the trama *F. subundatus*
5. Generative hyphae clamped, hyphae not agglutinated, cystidia easily observed 6

6. Basidiomes cinnamon to brick-red or cream to straw colored, tough and somewhat waxy, basidiospores sub-cylindrical 7
6. Basidiomes white to cream or pinkish, thin, papery to corky, basidiospores globose to widely-ellipsoid 8
7. Pore surface brick-red, pale cinnamon or dull red *S. meridionalis*
7. Pore surface cream to beige *S. polycystidiferum*
8. Basidiomes pale pinkish cream to pale orange-pink, basidiospores broadly ellipsoid to ovoid (3.0–4.0 × 2.0–3.0 μm), cystidia heavily incrustated *S. neonitidum*
8. Basidiomes white to cream, basidiospores globose to subglobose, cystidia smooth *J. globospora*
9. Basidiomes resinous-hard when dried, hyphae strongly agglutinated and hard to observed 10
9. Basidiomes corky to tough, hyphae not agglutinated and easily observed 11
10. Basidiomes growing clusters, usually dorsally attached, cystidia clavate, heavily incrustated *F. minutus*
10. Basidiomes solitary, cystidia elongated with a ventricose apex, smooth *J. neotropica*
11. Basidiomes flexible when fresh becoming papery to corky upon drying, pores 5–6/mm, basidiospores 4.5–5.0 × 3.5–4.5 μm *S. undigerum*
11. Basidiomes tougher, somewhat dense when dried, pores 8–10/mm, basidiospores 2.5–3.5 × 2.0–3.0 μm *J. semisupiniformis*

Discussion

Our results reveal that all studied Neotropical *Junghuhnia* are not related to the generic type, *J. crustacea*, but are placed in three different clades:

Steccherinum clade

Type species: *Steccherinum ochraceum*

Steccherinum meridionalis, *S. neonitidum*, *S. polycystidiferum* and *S. undigerum* are part of this group. Even though *Steccherinum* is well supported within the Residual Polyporoid clade (Binder et al. 2013, Miettinen et al. 2012), the *Steccherinum* clade is not yet resolved and more data are needed to a better understanding of the evolutionary relations of its species. For the time being we decided to consider *Steccherinum* in a wide sense and to transfer the

studied species into this genus. If the genus is further splitted, the neotropical species could be transferred to *Chaetoporus*, a genus name available with *C. nitidus* (Pers.) Donk (= *Junghuhnia nitida*) as type species (Donk 1967, Miettinen et al. 2012). The only exception being *S. undigerus*, which groups close to *Steccherinum ochraeum*, type species of *Steccherinum*. However, to the present there are no morphological characters that would support the segregation of *Steccherinum* in different genera. Furthermore, the current wide delimitation of *Steccherinum* has a high phylogenetic support and can be defined morphologically by dimitic species with incrustated skeletocystidia and small subglobose to subcylindrical spores. Further studies including more molecular and morphological data may confirm if *Steccherinum* wide genus or if it in fact encompasses several small genera.

Flaviporus

Type species: *Flaviporus brownii*

Our molecular data shows that *Junghuhnia minuta* and *Junghuhnia subundata* group with *Flaviporus*, which is also supported by morphology. The species in *Flaviporus* are separated phylogenetically by rather long branches (Fig. 1), which may indicate that there are missing data that could clarify the relation among the species of this group. Morphologically, species in *Flaviporus* present basidiomes that become very hard and somewhat resinous after drying, cystidia with variable shape and strongly agglutinated hyphae, which support the genus as monophyletic. *Flaviporus subundatus* differs by lacking clamp connections in the generative hyphae. Notwithstanding, our molecular data support keeping this species under *Flaviporus*. Future studies including a wider sampling may clarify if the presence of clamp connections is variable in the genus or if *F. subundatus* belongs to a separate lineage. For full descriptions see Lowe (1966), Ginns (1980) and Westphalen & Silveira (2012).

Cordiana

Type species: *Cordiana carneola*

This third group recognized in this study comprises two species previously identified as *Junghuhnia carneola* that belong to the phlebiod clade. The phylogenetic position of these species is supported by biological data, since *J. carneola* was characterized by having a bipolar mating system and an astatocoenocytic nuclear behavior (David & Rajchenberg 1985), a combination typical of the phlebiod species, while species of *Steccherinum* are tetrapolar and present a normal nuclear behavior (Rajchenberg 2011). Morphological and molecular data obtained support the description of a new genus and a new species. *Cordiana*

is unique among polypores by the combination of basidiomes changing colour when bruised or after drying, the presence of long, finely incrusting cystidia and by the dimitic hyphal system with clamped generative hyphae and metachromatic skeletal hyphae. The two species identified in the genus are very similar but can be distinguished by the pore surface (larger, irregular and strongly split pores in *C. carneola* and smaller regular pores in *C. davidii*) and by a small difference in spore shape (Fig. 4).

The data presented in this study expand the knowledge of *Junghuhnia* s.l. in the Neotropics and are in agreement with Miettinen et al. (2012). However, more studies are required to clarify the evolutionary relationships of species previously treated as *Junghuhnia*, especially the ones included in the *Steccheirnum* clade. Furthermore, the phylogenetic positions of *J. semisupiniformis*, *J. chlamydospora*, *J. globospora* and *J. neotropica* are still unknown. Here we segregated these four species by morphological groups and presented them in the identification key, but molecular data are needed to verify their proper generic position. Ryvar den & Iturriaga (2010) also included the species *J. sobrius* in their identification key of Neotropical *Junghuhnia* taxa. Since this combination was never validly published and the species was originally characterized by the presence of gloeocystidia (Lowe 1977) we chose to exclude it from *Junghuhnia* s.l.

Acknowledgements

The authors would like to thank BPI, FLOR, O and S herbaria for the loan of collections and Dr. Mateus A. Reck and MSc. Dirce L. Komura for the images of fresh basidiomes. FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil. Grant number: 2011/17219-0), European Social Fund and the state budget of the Czech Republic (Project Indicators of trees vitality Reg. No. CZ.1.07/2.3.00/20.0265) are acknowledged for financial support.

References

Binder M, Justo A, Riley R, Salamov A, López-Giráldez F, Sjökvist E, Copeland A, Foster B, Sun H, Larsson E, Larsson KH, Townsend J, Grigoriev IV, Hibbett DS. 2013. Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. *Mycologia* 105:1350–1373. doi:10.3852/13-003

- Boidin J. 1958. Essai biotaxonomique sur les Hydnés résupinés et les Corticiés. *Revue de Mycologie. Mémoire Hors Série 6*: 1–387.
- Boidin J. 1971. Nuclear behavior in the mycelium and the evolution of Basidiomycetes. In: Petersen RH, ed. *Evolution in the higher Basidiomycetes*. Knoxville: Univ. Tennessee Press. p 129–148.
- Bresadola G. 1896. Fungi Brasilienses lecti a cl. Dr. Alfredo Möller. *Hedwigia* 35: 276-302.
- Carranza-Velásquez J, Ruiz-Boyer A. 2005. Checklist of polypores of Costa Rica. *Revista Mexicana de Micología* 20:45–52.
- Chen JJ, Cui BK. 2014. *Phlebiporia bubalina* gen. et. sp. nov. (Meruliaceae, Polyporales) from Southwest China with a preliminary phylogeny based on rDNA sequences. *Mycological Progress* 13: 563–573. doi 10.1007/s11557-013-0940-4
- David A, Rajchenberg M. 1985. Pore Fungi from French Antilles and Guiana. *Mycotaxon* 22: 285–325.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9(8): 772–772. doi: 10.1038/nmeth.2109
- Donk MA. 1967. Notes on European polypores - II. *Persoonia*. 5(1):47-130
- Floudas D, Hibbett DS. 2015. Revisiting the taxonomy of *Phanerochaete* (Polyporales, Basidiomycota) using a four gene dataset and extensive ITS sampling. 119:679-719
- Ginns J. 1980. The genus *Flaviporus* Murrill (Polyporaceae). *Can. J. Bot.* 58: 1578-1590.
- Guindon S, Gascuel O. 2003. PhyML: A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52 (5): 696-704.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hallenberg N. 1984. Compatibility between species of Corticiaceae s. l. (Basidiomycetes) from Europe and North America. *Mycotaxon* 21:335-388.
- Hibbett D, Bauer R, Binder M, Giachini AJ, Hosaka K, Justo A, Larsson E, Larsson KH, Lawrey JD, Miettinen O, Nagy L, Nilsson RH, Weiss M, Thorn RG. 2014. Agaricomycetes. Pp. 373-429 In: *The Mycota*, vol. VII, Second Ed., Part A. Systematics and Evolution (D. J. McLaughlin and J. W. Spatafora, eds.). Springer Verlag.
- Lindblad I, Ryvar den L. 1999. Studies in neotropical polypores. 3. New and interesting Basidiomycetes (Poriales) from Costa Rica. *Mycotaxon*. 71:335-359
- Lowe JL. 1966. Polyporaceae of North America. The genus *Poria*. State University College of Forestry at Syracuse University, Technical Publication n° 90, 183 p.

- Lowe JL. On *Polyporus sobrius*. 1977. Kew Bulletin 31(3): 753–754.
- Miettinen O, Larsson E, Sjökvist E, Larsson KH. 2012. Comprehensive taxon sampling reveals unaccounted diversity and morphological plasticity in a group of dimitic polypores (Basidiomycota, Polyporales), Cladistics 28:251–270. doi: 10.1111/j.1096-0031.2011.00380.x
- Nikolcheva LG, Bärlocher F. 2004. Taxon-specific primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. Mycol Prog 3:41–49. doi:10.1007/s11557-006-0075-y
- Rajchenberg, M. 1983. New South American Resupinate Polypores. Mycotaxon 16: 500-506.
- Rajchenberg M. 1987. Type studies of Polyporaceae (Aphylophorales) described by J. Rick. Nordic J. Bot. 7: 553–568.
- Rajchenberg M. 2003. Taxonomic studies on selected Austral polypores, Austral. Syst. Bot. 16:473–485.
- Rajchenberg M. 2011. Nuclear behavior of the mycelium and the phylogeny of Polypores (Basidiomycota). Mycologia 103(4): 677–702.
- Rehner SA, Buckley EP. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. Mycologia 97:84–98. doi: 10.3852/mycologia.97.1.84
- Rick J. 1960. Basidiomycetes Eubasidii in Rio Grande do Sul – Brasilia 4. Meruliaceae, Polyporaceae e Boletaceae. Iheringia Série Botânica 7: 193-295.
- Robledo GL, Rajchenberg M. 2007. South American polypores : first annotated checklist from Argentinean Yungas. Mycotaxon 100: 5–9.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres D, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.3: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61: 539–542. doi: 10.1093/sysbio/sys02
- Ryvarden L. 1991. Genera of Polypores: Nomenclature and taxonomy. Synopsis Fungorum 5: 1-363.
- Ryvarden L. 2007. Studies in Neotropical Polypores 23. New and interesting wood-inhabiting fungi from Belize. Synopsis Fungorum 23: 32-50
- Ryvarden L. 1985. Type studies in the Polyporaceae 17. Species described by W.A. Murrill. Mycotaxon. 23:169-198
- Thiers B. 2015. Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/ih/>

- Tomšovský M, Menkis A, Vasaitis R. 2010a. Phylogenetic relationships in European *Ceriporiopsis* species inferred from nuclear and mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Fung. Biol.* 114:350–358. doi: 10.1016/j.funbio.2010.02.004
- Tomšovský M, Sedlák P, Jankovský L. 2010b. Species recognition and phylogenetic relationships of European *Porodaedalea* (Basidiomycota, Hymenochaetales). *Mycological Progress* 9(2): 225–233. doi: 10.1007/s11557-009-0628-y
- Westphalen MC, Reck MA & Silveira RMB. 2010. *Ganoderma chalceum* and *Junghuhnia meridionalis*: new records from Brazil. *Mycotaxon* 111: 11–18.
- Westphalen, M.C.; Borges da Silveira, R.M. 2012. Resupinate polypores from mixed ombrophilous forests in southern Brazil. *Mycotaxon.* 122:111-122
- Westphalen MC, Reck MA, Silveira RMB. 2012. The Genus *Junghuhnia* in Brazil. *Nova Hedwigia* 94: 209–220.

CAPÍTULO IV

- Artigo publicado no periódico Mycological Progress 14:100 (2015) -

***Bjerkandera* in the Neotropics: phylogenetic and morphological relations of *Tyromyces atroalbus* and description of a new species**

Mauro C. Westphalen¹*, Michal Tomšovský², Jiří Kout³ & Adriana M. Gugliotta¹

¹ Núcleo de Pesquisa em Micologia, Instituto de Botânica, Av. Miguel Estefano 3687, 04301-90, São Paulo, SP, Brazil.

² Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 3, CZ-61300, Czech Republic

³ Department of Biology, Geosciences and Environmental Education, Faculty of Education, University of West Bohemia, Klatovská 51, Pilsen, 306 19, Czech Republic

*Corresponding author: maurowestphalen@yahoo.com.br

Abstract

Bjerkandera is a worldwide polypore genus characterized by the pileate grayish basidiomes, often becoming darker when dried, and monomitic hyphal system. *Tyromyces atroalbus* is a rare Brazilian species re-discovered in recent surveys in São Paulo State. Even though it has been placed in *Tyromyces* it presents a characteristic darkening of basidiomes when touched or dried, feature absent in other species of the genus. In order to understand the evolutionary relations of *T. atroalbus* with *Bjerkandera* and *Tyromyces* and find its proper phylogenetic placement, morphological and molecular studies were carried out. Specimens from Brazil and Mexico were studied morphologically and selected specimens were used for DNA sequence analyses of internal transcribed spacer and large subunit of ribosomal RNA gene and translation elongation factor 1-alpha gene. Type specimens of *T. atroalbus* and *T. humeana* were also morphologically examined to confirm their possible synonymy as well as to confirm the identity of the recent collections. Molecular and morphological characters of *T. atroalbus* place the species in *Bjerkandera*. Our results also revealed that the specimens from Brazil and Mexico represent two distinct species. Therefore, the new combination *Bjerkandera atroalba* and description of new species *B. centroamericana* is published. In addition, the type study of *T. atroalbus* and *T. humeana* supports their synonymy.

Key words: Taxonomy, Basidiomycota, Polyporales, Phlebioid clade.

Introduction

The genus *Bjerkandera* P. Karst. is characterized by species with pileate basidiomes, monomitic hyphal system and hyaline basidiospores. Although there are several names associated with *Bjerkandera* in Mycobank database (<http://www.mycobank.org/>), most of those are currently treated as synonyms or are older records with very little data available. In recent works, only two species are included in the genus and registered frequently in different regions of the globe, *B. adusta* (Willd.) P. Karst. and *B. fumosa* (Pers.) P. Karst. (Bernicchia 2005, Gilbertson & Ryvardeen 1986, Ryvardeen & Gilbertson 1993, Nunez & Ryvardeen 2001, Baltazar & Gibertoni 2009). Both species are rather similar morphologically and can be differed by the size of pores and presence of paler tubes separated from the context by a dark line in the later (Ryvardeen & Gilbertson 1993).

Tyromyces atroalbus (Rick) Rajchenb. is a rare species described by Rick (1935) and later validated by Rajchenberg (1987), who selected a lectotype from the PACA herbarium collection. *Tyromyces humeana* (Murrill) J. Lowe, described from North America (Lowe 1975), was proposed as a synonym of this species (Rajchenberg 1987). It is characterized by the white basidiomes that become dark when dried or bruised, with large pores (2–5/mm), monomitic hyphal system and hyaline, thin-walled, ellipsoid basidiospores. The genus *Tyromyces* P. Karst. is generally characterized by the pileate, usually white, short-lived basidiomes with monomitic hyphal system (or with skeletal hyphae in trama), generative hyphae with clamps and lack of true cystidia (Ryvardeen 1991), and most species with such features are placed in this genus. However, the type species of the genus, *T. chioneus* (Fr.) P. Karst., presents dimitic hyphal system and molecular data show that it is related to *Skeletocutis* Kotlaba & Pouzar and the *Antrodia* clade (Binder et al. 2013). In addition, species with different characteristics, as presence of gloecystidia or inflated hyphae, have also been placed in the genus, case of *T. aquosus* (Henn.) Ryvardeen (Ryvardeen 2012) and *T. hypocitrinus* (Berk.) Ryvardeen (Ryvardeen 1984). *Tyromyces atroalbus* differs from other species of the group by the darkening of the basidiomes when dried and distinctly monomitic hyphal system, characteristics common in species of *Bjerkandera*. However, it differs in the white basidiomes, since both *B. adusta* and *B. fumosa* present gray pore surface. In order to check the proper placement of *T. atroalbus* and clarify its relation with *Tyromyces* and *Bjerkandera*, morphological and molecular studies were carried out. Specimens identified as *T. atroalbus* from Brazil and Mexico were studied morphologically and selected specimens were used for DNA extraction. In addition, specimens of *B. adusta* from Europe and South

America and *B. fumosa* from Europe were added to the phylogenetic analysis dataset. Morphological and molecular data on all species are presented, corroborating to the description of a new species and a new combination. Descriptions, comments, illustrations and an identification key are presented.

Material and methods

Specimens of *T. atroalbus* from SP herbarium in Brazil and three collections from Mexico (J. Kout personal collection) were used for morphological and molecular analysis. Additional specimens of *B. adusta* and *B. fumosa* from BRNM herbarium were also included to molecular analysis. In addition, the types of *Polyporus atroalbus* Rick (as *P. albo-ater*) from PACA herbarium and *Trametes humeana* Murrill from NY herbarium were studied for morphological comparison and confirmation. For microscopic analysis, hand-cut sections of the basidiomes were mounted on microscope slides with a drop of 3% KOH solution and 1% aqueous phloxine solution. All microscopic structures were measured with aid of an eyepiece micrometer and twenty to thirty measurements were taken from each structure present. Drawings of the microstructures were made with the aid of a drawing tube. For DNA extraction, the first 10 steps of DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) protocol were followed. The samples were then sent to Department of Chemistry and Biochemistry of Mendel University in Brno (Czech Republic), where DNA extraction was continued using magnetic-bead technology of MagNA Pure compact system. When needed, DNA was purified using DNA Clean & Concentration Kit (Zymo Research). DNA amplification of the regions ITS and LSU were performed using ITS5/ITS4-Basidio (Nikolcheva and Bärlocher 2004) primer combination for ITS and LR0R/LR6 that for LSU. The PCR regimes followed Tomšovský et al. (2010a). For *tef1*-alpha (primers: 983F/2218R) region, touchdown PCR with gradually reduced annealing temperature (60–50°C) was performed (Rehner & Buckley 2005). In some samples where PCR did not present good results, a nested PCR was performed according to Tomšovský et al. (2010b).

Amplification products were sent for sequencing in MacroGen Ltd. (Korea). The sequences obtained were initially edited in the BioEdit software (Hall 1999) and aligned using the MAFFT online server and adjusted manually. Reference sequences were chosen based on Moreno et al. (2011), Miettinen & Rajchenberg (2012), Miettinen et al. (2012), Jung et al. (2014) and through BLAST searches in the NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The sequences used in this study are summarized

in Table 1. The dataset of sequences was aligned using MAFFT online server and used for the construction of phylogenetic trees applying Bayesian inference in the software MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al. 2012). The evolutionary models were inferred with the jModelTest 2.c1.4 (Darriba et al. 2012).

Table 1. List of sequences used in this study. * Sequences obtained in this study

Specimen	GenBank No.		
	ITS	LSU	tef1
<i>Antrodiella americana</i>	JN710509	JN710509	JN710711
<i>Antrodiella faginea</i>	JN710514	JN710514	JN710712
<i>Aurantiporus alborubescens</i>	JQ821319	JQ821318	
<i>Aurantiporus fissilis</i>	HQ728292	HQ729002	
<i>Bjerkandera adusta</i> *	KT305935	KT305935	KT305938
<i>Bjerkandera adusta</i> *	KT305936	KT305936	
<i>Bjerkandera adusta</i>	KJ704813	KJ704828	
<i>Bjerkandera cf. adusta</i>	KJ831920	KJ831920	
<i>Bjerkandera cf. adusta</i>	KJ831951	KJ831951	
<i>Bjerkandera fumosa</i>	KJ704824	KJ704839	
<i>Bjerkandera atroalba</i> *	KT305930	KT305930	
<i>Bjerkandera atroalba</i> *	KT305931	KT305931	KT305939
<i>Bjerkandera atroalba</i> *	KT305932	KT305932	KT305940
<i>Bjerkandera centroamericana</i> *	KT305933	KT305933	KT305941
<i>Bjerkandera centroamericana</i> *	KT305934	KT305934	KT305942
<i>Bjerkandera fumosa</i> *	KT305937	KT305937	
<i>Byssomerulius corium</i>	AY463389	AY586640	
<i>Ceraceomyces violascens</i>	EU118611	EU118612	
<i>Ceriporia viridans</i>	AF347109	AF347109	
<i>Ceriporiopsis gilvescens</i>	HQ659222	HQ659222	
<i>Gleoporus dichrous</i>	EU546097	FJ496709	
<i>Gleoporus taxicola</i>	JX109847	JX109847	JX109901
<i>H. corrugata</i>	EU118630	EU118630	
<i>Irpex lacteus</i>	JX109852	JX109852	JX109911
<i>Junghuhnia nitida</i>	JN710560	JN710560	JN710721
<i>Mycoacia fuscoatra</i>	JN649352	JN649352	JX109908
<i>Mycoacia nothofagi</i>	GU480000	GU480000	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	HQ188436	GQ470643	HQ188379
<i>Phanerochaete sordida</i>	EU118653	EU118653	
<i>Phlebia nitidula</i>	EU118655	EU118655	
<i>Phlebia radiata</i>	AY854087	AF287885	AY885156
<i>Phlebioporia bubalina</i>	KC782526	KC782528	
<i>Trametopsis cervina</i>	JN165020	JN164796	JN164882
<i>Tyromyces chioneus</i>	HQ659244	HQ659244	
<i>Tyromyces sp.</i>	JN710603	JN710603	JN710734

Results

Molecular analysis confirmed that *Tyromyces atroalbus* belongs to *Bjerkandera* and is separated from *Tyromyces* (Figs. 1 and 2), which can be supported by the morphological features, as the pileate basidiomes that become dark when dried and monomitic hyphal system. In addition, the studied Mexican specimens identified as *T. atroalbus* represent a distinct species, which is characterised by different DNA sequences and remarkably smaller pores. The analysis of types of *Polyporus atroalbus* and *Trametes humeana* support their synonymy and confirmed the identity of the new Brazilian collections. Full descriptions on the two neotropical *Bjerkandera* are presented below. The morphological characters of *B. adusta* and *B. fumosa* followed data published by Ryvardeen & Gilbertson (1993) and Bernicchia (2005) and supported placement of *T. atroalbus* in this genus. The detailed morphological analysis of *B. adusta* and *B. fumosa* was not conducted due to incomplete sampling (more comments in Discussion).

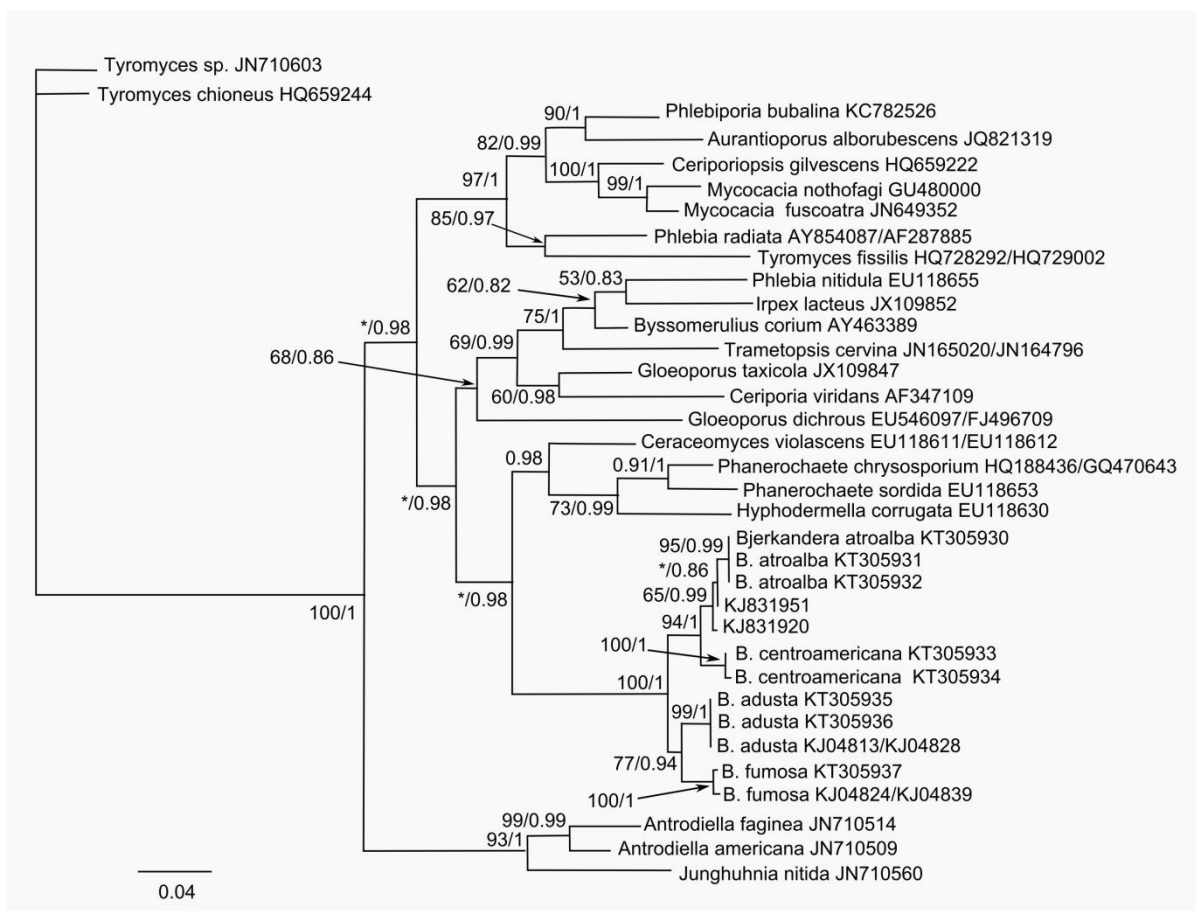


Fig.1 The phylogenetic tree of ITS-LSU region conducted by Bayesian analysis (the legends to numbers see at Table 1). Numbers at branches indicate Maximum likelihood bootstrap proportion and Bayesian posterior probability values. The asterisk (*) marks different topology in both analyses. The bar indicates number of expected substitutions per position.

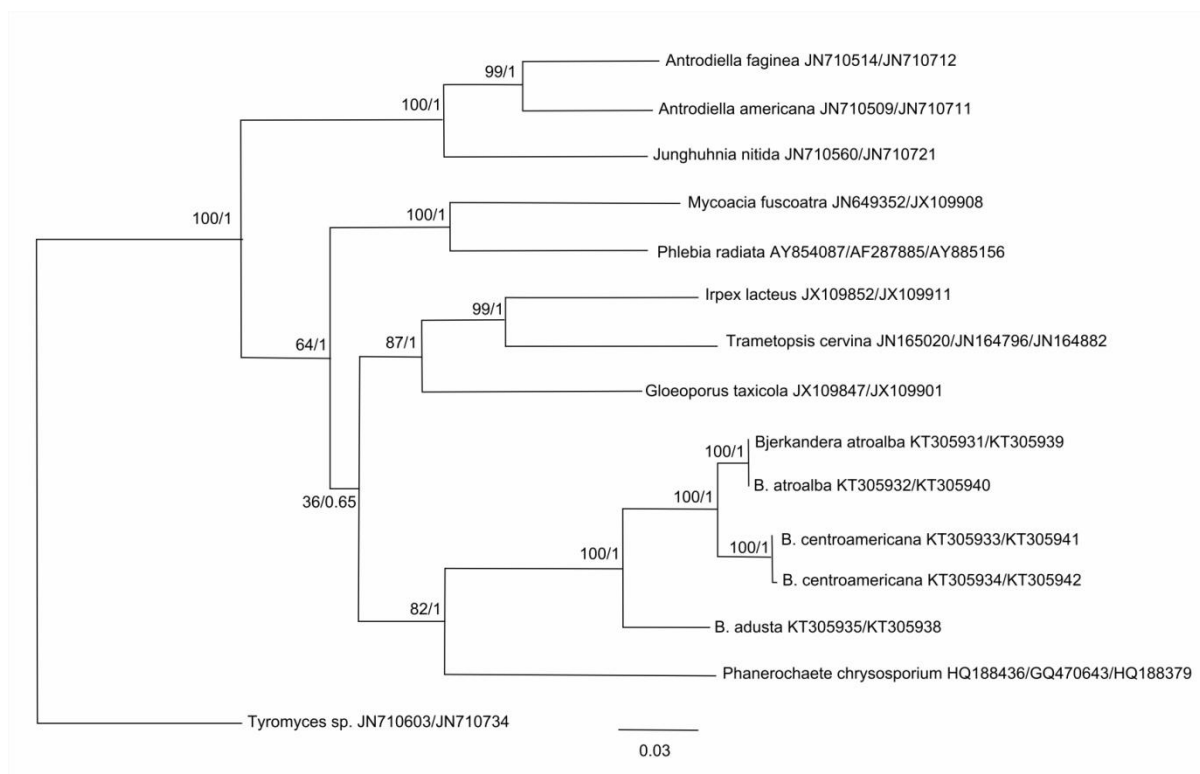


Fig.2 The phylogenetic tree of ITS-LSU-tef1 region conducted by Bayesian analysis (the legends to numbers see at Table 1). Numbers at branches indicate Maximum likelihood bootstrap proportion and Bayesian posterior probability values. The asterisk (*) marks different topology in both analyses. The bar indicates number of expected substitutions per position.

Bjerkanthera atroalba (Rick) Westphalen & Tomšovský, combination novum, MB 813009 (FIG. 1–2)

≡ *Polyporus atroalbus* Rick, Brotéria, Ci. nat.: 25 (1935) [MB#374944] basionym

≡ *Tyromyces atroalbus* (Rick) Rajchenb., Nordic Journal of Botany 7 (5): 558 (1988) [MB#134032]

= *Trametes humeana* Murrill, Bulletin of the Torrey Botanical Club 65: 656 (1938) [MB#267422]

≡ *Tyromyces humeana* (Murrill) J. Lowe, Mycotaxon 2 (1): 25 (1975) [MB#325209]

Basidiomes annual, pileate, sessile to effused-reflexed, dimidiate, often imbricate, soft and somewhat flexible when fresh, becoming corky after dried, up to 8 cm wide and 3 cm thick; pileus white to cream, becoming dark when touched and after dried, then pale brownish-gray to dark gray, flattened to convex, surface glabrous to somewhat velutinate and azonate; margin thin, acute, becoming black on dried specimens; pore surface white to cream, becoming dark when touched or after dried, pores large, regular, round or more commonly angular, with thin dissepiments, sometimes partially dilacerate after dried, 2–5/mm; tubes

concolorous with the pore surface, slightly darker than the context in dried specimens, up 1.5 cm deep; context white to cream, homogeneous or with interwoven thin black lines, somewhat fibrous, up to 1.5 cm thick.

Hyphal system monomitic; generative hyphae clamped, smooth and hyaline, 3–6 μm wide, frequently branched, interwoven, in the trama thin to slightly thick walled, up to 4 μm wide, in the context with somewhat thicker walls, but never resembling skeletal hyphae, up to 6 μm wide; inflated hyphal ends present in the dissepiments, club-shaped to capitate. Fusoid cystidioles present in the hymenium, 8–15 \times 3–5 μm . Basidia clavate, 4-sterigmate, 10–15 \times 4–5 μm ; basidiospores widely ellipsoid to narrowly ellipsoid, hyaline, smooth, thin-walled, IKI-, 4–5 \times 3–4 μm .

Ecology: Growing on dead hardwood logs in areas of Atlantic Rainforest (Dense Ombrophilous Forest) in South Brazil.

Remarks: *B. atroalba* is characterized by the whitish basidiomes that become darker after dried, the large pores, the monomitic hyphal system and the ellipsoid basidiospores. Even though this species has been treated as *Tyromyces*, both morphological and molecular data support that *Bjerkandera* is the proper genus to accommodate it. It differs from *B. adusta* and *B. fumosa* by the larger pores and whitish basidiomes when fresh. Lowe (1975) comments on the strong odor of anise as a characteristic of *T. humeana*, but we believe this is not a good character to add to the species definition as some specimens may not present this odor and it cannot be felt in dried materials. The darkening of the basidiomes is rather variable and often is more prominent on the margins. While some specimens may become dark brown to almost black, others present only a slight darkening, becoming beige to straw coloured.

Examined specimens: Brazil, Rio Grande do Sul, Pouso Novo, leg. J. Rick FR18397, 1932 (PACA lectotype of *P. atroalbus*) – São Paulo, Riberião Grande, Parque Estadual Intervales, leg. M.C. Westphalen 425/13, 05.2.2013 (SP 446205) – São Paulo, Parque Estadual da Cantareira, leg. M. Capelari and J.J.S.Oliveira 4626, 7.XI.2011 (SP 445630); leg. V. Motato-Vásquez 59, 6.XII.2011 (SP 445628); leg. V. Motato-Vásquez 158, 7.III.2012, (SP 445629); leg. V. Motato-Vásquez, M.C. Westphalen and A.C. Bolaños 248, 27.VI.2012 (SP 445530); leg. V. Motato-Vásquez and M.C. Westphalen 266, 30.VII.2012, (SP 445672) – USA, Florida, Barnesville, W.A. Murril (NY 00705029, holotype of *T. humeana*).

Bjerkandera centroamericana Kout, Westphalen & Tomšovský, sp. nov., MB 813443 (FIG. 1–2)

Holotype: Mexico, Veracruz, San Andrés Tuxtla municipality, near Montepío. Dead hardwood; 18.5750000° N, 095.0408333 °W; 14.X.2006, leg. Jiří Kout 0610/A7 (Holotype: SP 466336, Isotype: BRNM 771949.)

Etymology: *centroamericana* - refers to the region where the species was found.

Basidiomes sessile, pileate, effused-reflexed, reflexed up to 3 cm, up to 7 cm wide and 1 cm thick at the base, but generally not over 0.5 cm thick; upper surface of pileus white when fresh, cream to brownish in dry condition, dark on the base, slightly tomentose, velutinate, azonate, margin blunt in young, becoming sharp; pore surface sordid white, becoming dark brown or grey to black when wounded, pores angular, 7–11/mm, dissepiments thin, entire; context pale buff, sometimes with interwoven black lines that can form a thin dark layer on the pilear surface, up to 5 mm thick; tubes with one or more layers, then separated by black lines, white to cream when fresh, becoming slightly darker than the pores after dried, distinct from context by a thin unremarkable layer (slightly darker than context) at the base of tubes.

Hyphal system monomitic; hyphae with clamps (some septa without clamps also seen, but rare), hyaline, smooth, occasionally branching, interwoven, 2–5 µm wide, in the trama thin to slightly thick-walled, in the context similar but sometimes with somewhat thicker walls. Cystidioles fusoid, bottle-shaped, 10–25 × 4–5 µm. Basidia clavate, tetrasterigmatic, 10–14 × 5–6 µm. Basidiospores subglobose up to widely ellipsoid, hyaline, smooth, with small apiculus, IKI-, 4–5 × 3–4.5 µm.

Ecology: growing on dead hardwood at man-made habitats (municipal park or edge of path in cultivated landscape).

Remarks: *B. centroamericana* has a very similar morphology to *B. atroalba* and can be differed only by the fairly smaller pores (Fig. 3b). Microscopically, the basidiospores of *B. centroamericana* are slightly wider, subglobose to widely ellipsoid, while in *B. atroalba* they can be narrowly ellipsoid. However, there are cases of overlapping in basidiospores shape and size and only a detailed analysis of both species can reveal this difference.

Examined specimens (paratypes): Mexico, Veracruz, San Andrés Tuxtla municipality, near Montepío, Dead hardwood; 18.5750000° N, 095.0408333° W; leg. Jiří Kout 0610/A10, 14.X.2006 (BRNM 771945) – Tabasco, Villahermosa. Dead hardwood; 17.9891667° N, 092.9280556° W; leg. Jiří Kout 0610/A13, 18.X. 2006 (BRNM 771950).

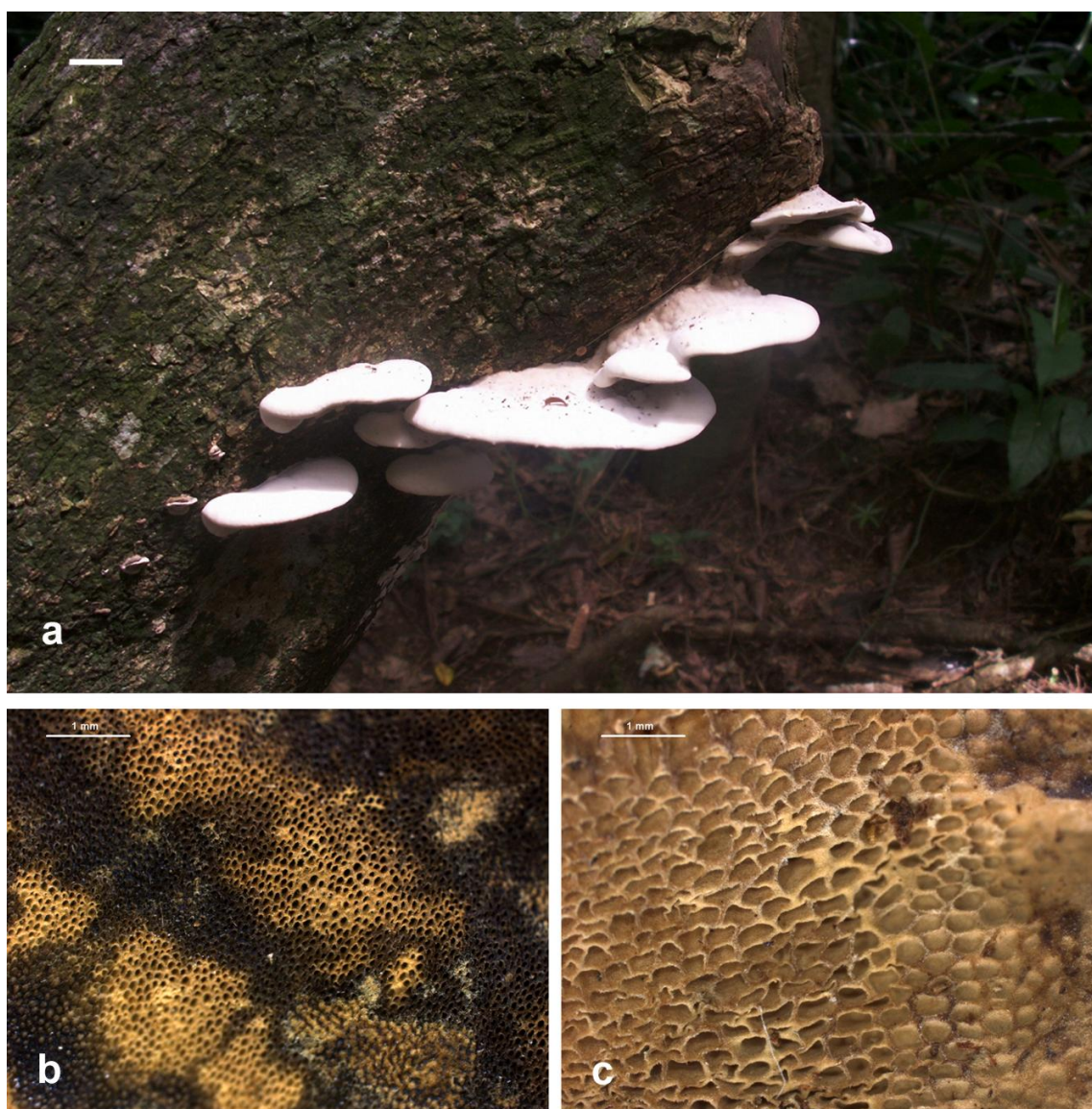


Fig.3 *Bjerkandera centroamericana* (a–b) and *B. atroalba* (c). **a.** Basidiomes – holotype (scale bar 1 cm). **b.** Pore surface detail (scale bar 1 mm). **c.** Pore surface detail (scale bar 1 mm). Pictures by J. Kout (a) and M.C. Westphalen (b–c)

Additional examined specimens: *Bjerkandera adusta*: Argentina, Patagonia, Trevelin, National park Los Alerces, Puerto Chucao, dead hardwood; 42.730043° S, 71.757992° W; leg. Matěj Pánek, det. Michal Tomšovský MT 48/2014, 15.XI.2014 (BRNM 771946) – Czech Republic, Brno, City centre, Mendel' s square, stump of *Aesculus hippocastanum*; 160 m a.s.l., 49.1908661° N, 16.5948944°E; leg. et det. Michal Tomšovský MT 49/2014, 18.XII.2014 (BRNM 771948) – *Bjerkandera fumosa*: Slovakia, Trenčín, Skalka nad Váhom, NW margin of village, bank of the Súčanka creek, stump of a hardwood (*Alnus* or *Populus*), 227 m a.s.l.; 48.9283056° N, 018.0628889° E; leg. et det. Michal Tomšovský MT 51/2013, 10.X.2013 (BRNM 771947).

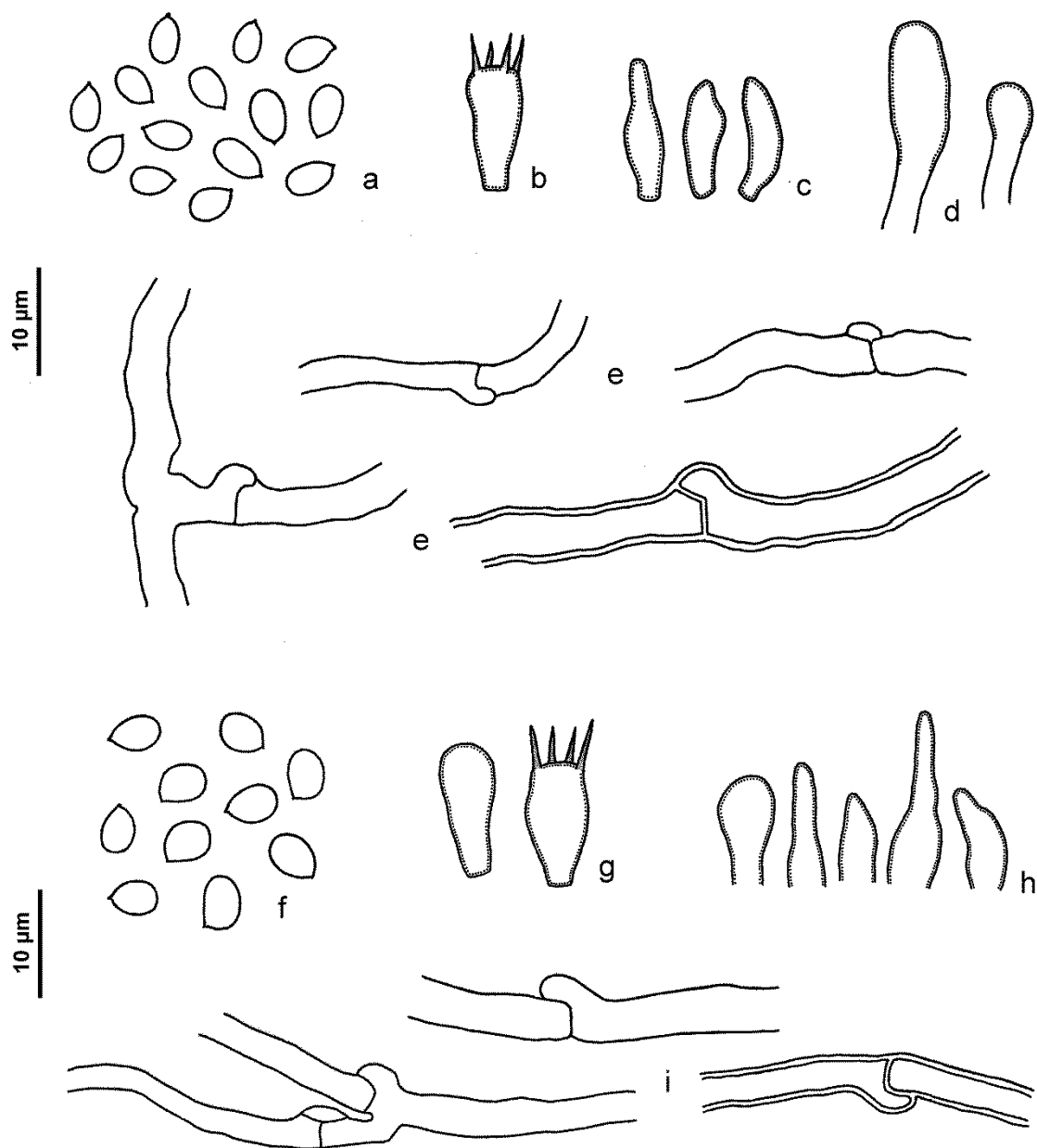


Fig. 4 *Bjerkandera atroalba* (a–e) and *B. centroamericana* (f–i). **a.** Basidiospores. **b.** Basidium. **c.** Cystidioles. **d.** Sterile elements from the dissepiments. **e.** generative hyphae. **f.** Basidiospores. **g.** Basidiole and basidium. **h.** Cystidioles. **i.** Generative hyphae. Illustrations by M.C. Westphalen (a–e) and J. Kout (f–i)

Identification key to species of *Bjerkandera*

- 1 Pore surface white to cream becoming dark when touched or after dried, tubes concolorous or only slightly darker than the context
- 2 Pores 2–5/mm, South American species *B. atroalba*
- 2* Pores 7–11/mm, Central American species *B. centroamericana*
- 1* Pore surface buff to grayish, somewhat darker after dried, tubes darker gray contrasting with the white context
- 3 Pores 2–5/mm, pore surface buff to smoky gray *B. fumosa*
- 3 Pores 6–7/mm, pore surface gray to almost black, cosmopolitan species *B. adusta*

Discussion

The phylogenetic analysis revealed the placement of samples identified as *T. atroalbus* from Brazil and Mexico in the genus *Bjerkandera* and that the two different lineages represent different species. Our results also show their relation to traditionally recognized *B. adusta* and *B. fumosa* and other genera form the Phlebioid clade. *Bjerkandera atroalba* and *B. centroamericana* are closely related, which is also supported by their very similar morphological characters. Both species are distinctive by the white to cream basidiomes that become dark when touched or after dried and they can be well differed only by the size of pores (2–5/mm in the former and 7–11/mm in the latter). The type revision of *Polyporus atroalbus* and *Trametes humeana* did not find any distinguishing characteristics that would support separating both species; therefore we choose to keep them as synonyms, as previously suggested by Rajchenberg (1987). More molecular data with the addition of DNA sequences of materials from USA could clarify if *B. atroalba* has in fact a wider distribution over the American continent or if the North American species may present differences at molecular level. In addition, we added to our dataset sequences available in GenBank of two specimens of endophyte fungi identified as *Bjerkandera* cf. *adusta* (Martin et al. 2015), which are closely related to *B. atroalba*. These sequences were obtained from endophytic fungi isolated from leaves of *Hevea brasiliensis*, in Peru, and may represent a local population differing from Brazilian one in ITS sequence or a new species in the genus. The endophytic phase of life cycle of *Bjerkandera* was also confirmed by Yuan et al. (2011). Genera *Tyromyces* and *Bjerkandera* were in past treated as closely related and Pouzar (1966) proposed *Bjerkandera* as a subgenus of *Tyromyces*. However, recent results of molecular phylogeny (e.g. Binder et al. 2013) clearly confirm independent taxonomic positions of the

two genera. All this may indicate that the genus *Bjerkandera* has been overlooked and that in fact encompasses more species and has a wider circumscription than as it has been traditionally treated. In addition, *B. adusta* and *B. fumosa* were described from temperate Europe and are reported throughout the globe. For example, our record of *B. adusta* from temperate Argentina has almost identical sequences as samples from Europe. Therefore, more work including molecular data is needed to confirm their diversity in other regions.

The micromorphological characters of *B. adusta* and *B. fumosa* are rather uniform. The basidiospore dimensions of *B. adusta* are $4.5\text{--}5.5(6) \times 2.3\text{--}3(3.5) \mu\text{m}$, while in *B. fumosa* they are usually longer, $5\text{--}6.5(7) \times 2.5\text{--}3.5 \mu\text{m}$. Our observations in micromorphology of both species follow those by Bernicchia (2005) and Ryvarden and Gilbertson (1993). More discriminative characters can be seen in macromorphology: *B. fumosa* has in general larger, more robust basidiomes and paler brownish to light gray pore surface, while in *B. adusta* pore surface varies from gray to almost black with paler margins. The number of pores is (5)6–7 per mm in *B. adusta* and (2)3–5 per mm in *B. fumosa*, but in older parts of the basidiomes that are attached to the substrate pores can be split (our observations, Bernicchia (2005), Ryvarden and Gilbertson (1993)). Nevertheless, the morphological diversity within the whole area of distribution of both species may be high as indicated by Jung et al. (2014) and worth to be studied in detail.

Acknowledgments

The authors would like to thank MSc. Ricardo Mateus Pires for the assistance in the computational analysis. FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil. Grant number: 2011/17219-0) and European Social Fund and the state budget of the Czech Republic (Project Indicators of trees vitality Reg. No. CZ.1.07/2.3.00/20.0265) are acknowledged for financial support.

References

- Baltazar JM, Gibertoni TB (2009) A checklist of the aphylloroid fungi (*Basidiomycota*) recorded from the Atlantic Rain Forest. *Mycotaxon* 109: 439–442.
- Bernicchia, A (2005) Polyporaceae s.l., *Fungi Europaei*, vol. 10, Candusso, Alassio.
- Binder M, Justo A, Riley R, Salamov A, López-Giráldez F, Sjökvist E, Copeland A, Foster B, Sun H, Larsson E, Larsson KH, Townsend J, Grigoriev IV, Hibbett DS (2013) Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. *Mycologia* 105:1350–1373. doi:10.3852/13-003

- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9(8): 772–772. doi: 10.1038/nmeth.2109
- Gilbertson RL, Ryvar den L (1986) North American polypores. *Abortiporus – Lindtneria*. Oslo, Fungiflora, v.1, 433pp.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Jung PE, Fong JJ, Park MS, Oh SY, Kim C, Lim YW (2014) Sequence Validation for the Identification of the White-Rot Fungi *Bjerkandera* in Public Sequence Databases. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2014), 24(10), 1313–1319. doi: 10.4014/jmb.1404.04021
- Lowe JL (1975) Polyporaceae of North America. The genus *Tyromyces*. *Mycotaxon* 2(1): 1–82.
- Martin R, Gazis R, Skaltsas D, Chaverri P, Hibbett D (2015) Unexpected diversity of basidiomycetous endophytes in sapwood and leaves of *Hevea*. *Mycologia* 107(2):284–97. doi: 10.3852/14-206.
- Miettinen O, Rajchenberg M (2012) *Obba* and *Sebipora*, new polypore genera related to *Cinereomyces* and *Gelatoporia* (Polyporales, Basidiomycota) *Mycol Progress* 11:131–147. doi: 10.1007/s11557-010-0736-8
- Miettinen O, Larsson E, Sjökvist E, Larsson KH (2012) Comprehensive taxon sampling reveals unaccounted diversity and morphological plasticity in a group of dimitic polypores (Basidiomycota, Polyporales), *Cladistics* 28:251–270. doi: 10.1111/j.1096-0031.2011.00380.x
- Moreno G, Blanco MN, Checa J, Platas G, Pelaez F (2011) Taxonomic and phylogenetic revision of three rare irpicoid species within the Meruliaceae. *Mycol Progress* 10:481–491. doi: 10.1007/s11557-010-0717-y
- Nikolcheva LG, Bärlocher F (2004) Taxon-specific primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. *Mycol Progress* 3:41–49. doi: 10.1007/s11557-006-0075-y
- Nuñez M, Ryvar den L (2000) East Asian Polypores. Vol. I. Fungiflora, Oslo.
- Pouzar Z (1966) Studies in the taxonomy of the Polypores II. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 1(1): 356–375. doi: 10.1007/BF02854587
- Rajchenberg M (1987) Type studies of Polyporaceae (Aphyllorphorales) described by J. Rick. *Nordic J. Bot.* 7: 553–568.

- Rehner SA, Buckley EP (2005) A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97:84–98. doi: 10.3852/mycologia.97.1.84
- Rick J (1935) *Polysticti Riograndenses*. *Brotéria Série Trimestral: Ciências Naturais* 4:121–138.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres D, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.3: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61: 539–542. doi: 10.1093/sysbio/sys02
- Ryvarden L (1984) Type studies in the Polyporaceae. 16. Species described by J.M. Berkeley, either alone or with other mycologists from 1856 to 1886. *Mycotaxon*. 20(2):329–363
- Ryvarden L (1991) Genera of Polypores: Nomenclature and taxonomy. *Synopsis Fungorum* 5: 1–363.
- Ryvarden L (2012) Type studies in Polyporaceae 27. Species described by P. Hennings. *Czech Mycology*. 64:13–21
- Ryvarden L, Gilbertson RL (1993) European Polypores, vol 1, *Synopsis Fungorum* 6. Oslo, Fungiflora, 387pp.
- Tomšovský M, Menkis A, Vasaitis R (2010a) Phylogenetic relationships in European *Ceriporiopsis* species inferred from nuclear and mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Fung. Biol.* 114:350–358. doi: 10.1016/j.funbio.2010.02.004
- Tomšovský M, Sedlák P, Jankovský L (2010b) Species recognition and phylogenetic relationships of European *Porodaedalea* (Basidiomycota, Hymenochaetales). *Mycological Progress* 9(2): 225–233. doi: 10.1007/s11557-009-0628-y
- Yuan ZL, Rao LB, Chen YC, Zhang CL, Wu YG (2011) From pattern to process: species and functional diversity in fungal endophytes of *Abies beshanzuensis*. *Fungal Biol.* 115(3):197–213. doi: 10.1016/j.funbio.2010.11.002

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram identificados dois novos gêneros e sete novas espécies de políporos no grupo estudado. Outras três espécies (*Antrodiella* sp., *Loweomyces* sp.3 e *Tyromyces* aff. *fumideiceps*) são possíveis novidades, mas apenas um material de cada foi coletado, necessitando, portanto, de mais coleções para confirmação e descrição. Além disso, sete novas combinações são ou serão propostas de acordo com os resultados obtidos. Os principais resultados deste trabalho são apresentados nos capítulos I, II e II, onde os dois novos gêneros e quatro das sete novas espécies identificadas são descritas. Em adição, o Capítulo IV apresenta um trabalho feito em parceria com pesquisadores da República Tcheca, onde uma nova espécie é descrita para o México e uma nova combinação para *Tyromyces atroalbus*, espécie descrita por Rick para o Rio Grande do Sul, é apresentada. Além dos três capítulos, outros dois artigos estão em fase de preparação. O primeiro trata de uma revisão de *Antrodiella* s.l. em regiões neotropicais, incluindo a descrição de uma nova espécie de *Antrodiella* ss(aqui tratada como *Antrodiella* aff. *semisupina*). Este artigo será semelhante ao apresentado no capítulo II, incluindo uma chave de identificação para todas as espécies neotropicais do grupo e comentários sobre os principais clados e gêneros que incluem espécies comumente tratadas como *Antrodiella*. O segundo artigo em fase de produção está sendo realizado em parceria com o pesquisador finlandês Otto Miettinen (Universidade de Helsinki) e trata do clado *Mycorrhaphium* /*Trulla*. Este artigo incluiria a descrição oficial do gênero *Trulla* e também o estudo dos materiais brasileiros identificados como *Flaviporus subhydrophilus*, que, na verdade, se trata de uma nova espécie pertencente a este grupo. Apesar de ainda não estarem claras as relações morfológicas e filogenéticas desta espécie, já que morfológicamente se assemelha mais a *Trulla* e filogeneticamente está mais próxima de *Mycorrhaphium*, ela provavelmente será descrita em um novo gênero. Estudos de cultivos também estão sendo realizados e poderão auxiliar na distinção dos dois novos gêneros deste grupo.

Apesar de os resultados aqui apresentados resolverem as questões taxonômicas de muitas das espécies estudadas, mais dados ainda são necessários para esclarecer alguns dos clados. Um exemplo é o clado *Steccherinum* que, mesmo com a adição de diversas espécies à filogenia, ainda não está claro quanto à relação das espécies e possíveis gêneros que ocorrem neste grupo. Estudos morfológicos detalhados, bem como estudos de cultivos, podem auxiliar nesta questão e verificar se existem diferenças morfológicas que suportem a separação de *Steccherinum* em diversos gêneros. Já *Flaviporus liebmannii* parece ser um complexo de

espécies de difícil limitação, onde pequenas diferenças na forma dos esporos podem ser observadas. Além de mais estudos filogenéticos, uma ampla amostragem de materiais de diversas regiões (incluindo espécimes do México, para onde a espécie foi originalmente descrita) são necessários para a separação morfológica das espécies deste complexo.

Os resultados obtidos neste trabalho representam uma importante contribuição para o conhecimento de políporos em geral, e mostram que a união de caracteres morfológicos, biológicos e filogenéticos podem auxiliar em uma melhor delimitação para grupos de difícil identificação. Também fica claro que as características do sistema hifal tradicionalmente utilizadas não se aplicam a muitos dos gêneros onde as espécies estudadas se agrupam. Por este motivo, muitas espécies do grupo foram identificadas ou descritas incorretamente, o que também pode ser observado nas revisões de herbário realizadas, onde muitos materiais foram identificados em gêneros que apresentam características das hifas muito distintas. Isto ressalta a importância de se realizar análises mais minuciosas das hifas e demais estruturas presentes nas diversas partes dos basidiomas, fornecendo descrições micromorfológicas detalhadas, e de se propor novas circunscrições para os gêneros e espécies deste e outros grupos de políporos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahão MC, Gugliotta AM, Bononi VLR. 2012. Xylophilous Agaricomycetes (Basidiomycota) of the Brazilian Cerrado. *Check List* 8(6):1102–1116.
- Alexopoulos CJ, Mims CW. 1979. *Introductory mycology*. 3. ed. New York, John Wiley, 632pp.
- Armstrong CG, Conte CE. 2010. Taxocenose de anuros (*Amphibia: Anura*) em uma área de Floresta Ombrófila Densa no Sul do Brasil. *Biota Neotropica* 10 (1): 39–46.
- Baltazar JM, Gibertoni TB. 2009. A checklist of the aphylophoroid fungi (Basidiomycota) recorded from the Atlantic Rain Forest. *Mycotaxon* 109: 439–442.
- Baltazar JM, Trierveiler-Pereira L, Loguercio-Leite C. 2009. A checklist of xylophilous basidiomycetes (Basidiomycota) in mangroves. *Mycotaxon*, 107, 221–224.
- Binder M, Justo A, Riley R, Salamov A, López-Giráldez F, Sjökvist E, Copeland A, Foster B, Sun H, Larsson E, Larsson KH, Townsend J, Grigoriev IV, Hibbett DS. 2013. Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. *Mycologia* 105:1350–1373. doi:10.3852/13-003
- Blackwell M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? *American Journal of Botany* 98 (3): 426–438.
- Boddy L. 1991. Importance of wood decay fungi in forest ecosystems. *In*: Arora DK, Rai B, Mukerji KG, Knudsen GR (eds.). *Handbook of Applied Mycology. Volume 1: Soil and Plants*. New York, Marcel Dekker *et al.* p. 507-540.
- Boddy L, Frankland JC, van West P. 2008. *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes*. London, Academic Press. 372p
- Boidin J. 1958. Essai biotaxonomique sur les Hydnés résupinés et les Corticiés. *Revue de Mycologie. Mémoire Hors Série* 6: 1–387.
- Boidin J. 1964. Valeur des caractères cultureux et cytologiques pour la taxonomie des Thelephoraceae résupinés et étalés-réflexis (Basidiomycètes). *Bulletin de la Société Botanique de France* 111: 309–315.
- Boidin J. 1971. Nuclear behavior in the mycelium and the evolution of *Basidiomycetes*. *In*: Petersen RH, ed. *Evolution in the higher Basidiomycetes*. Knoxville: Univ. Tennessee Press. p 129–148.
- Borba-Silva MA, Ferreira-Lopes V, Drechsler-Santos ER. 2013. New records of *Flaviporus hydrophilus* and *Phellinus portoricensis* (Fungi: Polypores). *CheckList* 9(4): 815-817.

- Corner EJH. 1932. A *Fomes* with two system of hyphae. Transactions of the British Mycological Society. 17: 51-81.
- Courtecuisse R. 2001. Current trends and perspectives for the global conservation of fungi. Pp. 7–18. In: Moore D, Nauta MM, Evans SE, Rotheroe M (eds). Fungal Conservation: Issues and Solutions. Cambridge: Cambridge University Press.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat. Methods 9(8): 772–772. doi: 10.1038/nmeth.2109
- David A. 1980. Étude du genre *Tyromyces* sensu lato: répartition dans les genres *Leptoporus*, *Spongiporus* et *Tyromyces* sensu stricto. Bulletin Société Linnéenne de Lyon 49: 6–56.
- David A. 1988. Bedeutung des Studiums des Kernverhaltens in der Systematik der Polyporaceae. In: Wolking F, ed. Internationales Aphyllophorales-Symposium Eisenstadt 1982. Graz: Austrian Academy of Sciences. p 23–28.
- David A, Rajchenberg M. 1985. Pore Fungi from French Antilles and Guiana. Mycotaxon 22: 285–325.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S., Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res. (Web Server issue):W465-9. Epub 2008 Apr 19.
- Drechsler-Santos ER, Groposo C, Loguercio-Leite C. 2008. Additions to the knowledge of lignocellulolytic basidiomycetes in forests from Santa Catarina, Southern Brazil. Mycotaxon 103: 197–200
- Fries E. 1821. Systema mycologicum. Vol.I.
- Fries E. 1838. Epicrisis systematis mycologici.
- Fries N. 1978. Basidiospore germination in some mycorrhiza-forming Hymenomycetes. Trans. Brit. Mycol. Soc. 70: 319-324.
- Gerber AL, Loguercio-Leite C. 1997. New records of polypores (Aphyllophorales) from southern Brazil. Mycotaxon 62: 305-318.
- Gilbertson RL, Ryvarden L. 1986. North American polypores. *Abortiporus – Lindtneria*. Oslo, Fungiflora, v.1, 433pp.
- Gilbertson RL, Ryvarden L. 1987. North American polypores. *Megasporoporia – Wrightporia*. Oslo, Fungiflora, v.2, 433-885pp.
- Ginns J. 1980. The genus *Flaviporus* Murrill (Polyporaceae). Canadian Journal of Botany 58: 1578–1590.

- Ginns J, Lindner D, Baronia T, Ryvarden L. 2010. *Aurantiopileus mayanensis* a new genus and species of polypore (Polyporales, Basidiomycota) from Belize with connections to existing Asian species. *North American Fungi*, 5, 1-10. doi: <http://dx.doi.org/10.2509/naf2010.005.004>
- Gomes-Silva A, Gibertoni TB. 2009. Checklist of the aphyllorphaceous fungi (*Agaricomycetes*) of the Brazilian Amazonia. *Mycotaxon* 108: 319–322.
- Groppo C, Loguercio-Leite C. 2005. Contribution to the lignocellulolytic fungi (*Basidiomycetes*) of the Atlantic Rain Forest in Southern Brazil. *Mycotaxon* 92: 103–106
- Guindon, S., Gascuel, O. 2003. PhyML: A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52 (5): 696-704.
- Gugliotta A, Fonsêca MP, Bononi VLR. 2010. Additions to the knowledge of aphyllorphoid fungi (*Basidiomycota*) of Atlantic Rain Forest in São Paulo State, Brazil. *Mycotaxon* 112: 335–338.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hallenberg N. 1984. Compatibility between species of *Corticaceae s. l.* (*Basidiomycetes*) from Europe and North America. *Mycotaxon* 21: 335-388.
- Hawksworth DL. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95: 641–655.
- Hawksworth DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105(12): 1422-1432.
- Hibbett DS, Binder M. 2002. Evolution of complex fruiting-body morphologies in Homobasidiomycetes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 296: 1963–1969.
- IPARDES. 2015. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br/>
- Joly CA, Leitão-Filho HF, Silva SM 1991. O patrimônio florístico. In: *Mata Atlântica - Atlantic Rain Forest*, I. de G. Câmara (ed.), pp. 94-125.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. 2008. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi*. 10th Edition, CABI Publishing. 771p.
- Kües U, James TY, Heitman J. 2011. Mating Type in Basidiomycetes: Unipolar, Bipolar, and Tetrapolar Patterns of Sexuality. *The Mycota* 14: 97-160.
- Kühner R. 1945a. Nouvelles recherches sur les divisions nucléaires dans la baside et les spores des Agaricales. *Les Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 220: 618–620.

- Kühner R. 1945b. Le problème de la filiation des Agaricales à la lumière de nouvelles observations d'ordre cytologique sur les Agaricales Leucosporées. Bulletin Société Linnéenne de Lyon 7/8: 160–169.
- Kühner R. 1945c. Remarques d'ordre technique sur l'étude de la répartition des noyaux dans les mycéliums de Basidiomycètes. Bulletin Société Linnéenne de Lyon 8/9: 177–181.
- Kühner R. 1948. Nouvelles observations sur la culture pure des homobasidiés et sur la particularités de leur mycélium secondaire. Bulletin Société Mycologique de France 65: 155–167.
- Lange L. 2011. The importance of fungi for a more sustainable future on our planet. Fungal Biology Reviews doi:10.1016/j.fbr.2010.12.002.
- Leite PF. 2002. Contribuição ao conhecimento fitoecológico do sul do Brasil. Ciência & Ambiente 24: 51-73.
- Lewinsohn TM, Prado PI. 2005. How many species are there in Brazil? Conservation Biology 19 (3): 619–624.
- Lodge J. 2001. Diversidad mundial y regional de hongos. Pp. 291–304. In: Hernandez HM, Garcia-Aldrete A, Alvarez F, Ulloa M (eds). Enfoques contemporáneos para 25 el estudio de la biodiversidad. Ciudad Universitario, Mexico: Ediciones Cientificas Universitarias, Unam y Fondo de Cultura Económica.
- Lowe JL. 1975. Polyporaceae of North America. The genus *Tyromyces*. Mycotaxon 2 (1): 1–82.
- Lutzoni F, Kauff F, Cox CJ, McLaughlin D, Celio G, Dentinger B, Padamsee M, Hibbett DS, James TY, Baloch E, Grube M, Reeb V, Hofstetter V, Schoch C, Arnold AE, Miądlikowska J, Spatafora J, Johnson D, Hambleton S, Crockett M, Shoemaker R, Sung G-H, Lucking R, Lumbsch T, O'Donnell K, Binder M, Diederich P, Ertz D, Gueidan C, Hansen K, Harris RC, Hosaka K, Lim Y-W, Matheny B, Nishida H, Pfister D, Rogers J, Rossman A, Schmitt I, Sipman H, Stone J, Sugiyama J, Yahr R, Vilgalys R. 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. American Journal of Botany 91: 1446–1480.
- Miettinen O, Larsson E, Sjökvist E, Larsson KH. 2012. Comprehensive taxon sampling reveals unaccounted diversity and morphological plasticity in a group of dimitic polypores (Basidiomycota, Polyporales). Cladistics 28:251–270.
- Miettinen O, Niemelä T, Spirin W. 2006. Northern *Antrodiella* species: the identity of *A. semisupina*, and type studies of related taxa. Mycotaxon 96: 211–239.

- Motato-Vásquez V, Pires RM, Gugliotta AM. 2014. Polypores from an Atlantic rainforest area in southeast Brazil: pileate species. *Brazilian Journal of Botany* 38(1): 149-164
- Mueller GM, Bills GF, Foster MS. 2004. *Biodiversity of Fungi*. 1st ed. Inventory and monitoring methods. Waltham: Academic Press.
- Mueller GM, Schmidt JP. 2007. Fungal Biodiversity: what do we know? What do we predict? *Biodiversity and Conservation* 16: 1–5.
- Nakasone KK. 1990. Cultural studies and identification of wood-inhabiting Corticiaceae and selected Hymenomycetes from North America. *Mycologia Memoirs* 15: 1–412.
- Nakasone KK. 1996. Diversity of lignicolous basidiomycetes in Coarse Woody Debris. In: McMinn JW, Crossley DA, eds. *Biodiversity and coarse woody debris in southern forests, proceedings of the workshop on coarse woody debris in southern forests: effects on biodiversity*. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station. 146pp.
- Niemelä T. 1998. *Steccherinum bourdotii* in North Europe. *Folia Cryptogamica Estõnica* 33: 93–97 .
- Nimer E. 1989. *Climatologia do Brasil*. 2ª ed. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro. 421 p.
- Nobles MK. 1958. Cultural characters as a guide to the taxonomy and phylogeny of the Polyporaceae. *Can J Bot* 36: 883–926.
- Nobles MK. 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Can J Bot* 43: 1097–1139.
- Nuñez M, Ryvarden L. 2000. *East Asian Polypores*. Vol. I. Fungiflora, Oslo.
- Nuñez M, Ryvarden L. 2001. *East Asian Polypores*. Vol. II. Fungiflora, Oslo.
- Overholts LO. 1953. *The Polyporaceae of the United States, Alaska and Canada*. London, Oxford University Press, 465pp.
- Patouillard N. 1900. *Essai taxonomique sur les familles et les genres des Hymenomycetes*. Paris, Lons-le-saunier, 184pp.
- Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA. 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 11(5): 1633-1644. doi:10.5194/hess-11-1633-2007.
- Pegler DN. 1973. *Aphylophorales IV: Poroid Families* *In: The Fungi, An Advanced Treatise*. Vol. 4B. London: Academic Press.
- Pegler DN. 1996. Hyphal analysis of basidiomata. *Mycological Research* 100(2): 129–142.

- Pires RM. Políporos (Basidiomycota) do Núcleo Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, SP, Brasil. 2015. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica.
- Rajchenberg M. 1987. New South American Polypores. *Mycotaxon* 28: 111-118.
- Rajchenberg M. 2006. Los Políporos (*Basidiomycetes*) de los Bosques Andino Patagónicos de Argentina. *Biblioteca Mycologica* 201: 1–300.
- Rajchenberg M. 2011. Nuclear behavior of the mycelium and the phylogeny of Polypores (Basidiomycota). *Mycologia* 103(4): 677–702.
- Rajchenberg M, Wright JE. 1987. Type studies of Corticiaceae and Polyporaceae (Aphylophorales) described by C. Spegazzini. *Mycologia*. 79(2):246-264
- Rajchenberg M, Gorjón SP, Pildain MB. 2011. The phylogenetic disposition of *Antrodia s.l.* (Polyporales, Basidiomycota) from Patagonia, Argentina. *Australian Systematic Botany* 24: 111–120.
- Rayner ADM. 1995. Fungi, a vital component of ecosystem function in woodland. *In*: Allsopp D, Colwell RR, Hawksworth DL (eds.). *Microbial Diversity and Ecosystem Function*. Cambridge, University Press. p. 231-251.
- Rea C. 1922. *British Basidiomycetae: A handbook to the larger British fungi*. 799 pp.
- Rehner SA, Buckley EP. 2005. Cryptic diversification in *Beauveria bassiana* inferred from nuclear its and ef1- alpha phylogenies. *Mycologia*. 97:84-98
- Ribeiro MC, JP Metzger, AC Martensen, FJ Ponzoni, MM Hirota. 2009. How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. Mr Bayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rossmann AY. 1994. A strategy for an all-taxa inventory of fungal biodiversity. *In*: Peng CI, Chou CH (eds) *Biodiversity and terrestrial ecosystems*. Academia Sinica Monograph Series 14: 169–194.
- Ryvarden L. 1991. Genera of Polypores: Nomenclature and taxonomy. *Synopsis Fungorum* 5: 1-363.
- Ryvarden L, Gilbertson RL. 1993. *European Polypores. Vol. I. Fungiflora*. Oslo, Noruega.
- Ryvarden L, Gilbertson RL. 1994. *European Polypores. Vol. II. Fungiflora*. Oslo, Noruega.
- Ryvarden L, Johansen I. 1980. *A preliminary polypore flora of East Africa*. Oslo, Fungiflora. 636pp.
- Ryvarden L, de Meijer AAR. 2002. Studies in neotropical polypores 14. New species from the state of Paraná, Brazil. *Synopsis Fungorum* 15: 34-69.

- SOS Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE. 2011. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, Período 2008 a 2012. Disponível em: <http://www.sosma.org.br>.
- SOS Mata Atlântica, INPE & ISA. 1998. Evolução dos Remanescentes Florestais e Ecossistemas Associados do Domínio da Mata Atlântica no Período de 1990-1995. SOS Mata Atlântica/ Instituto de Pesquisas Espaciais/ Instituto Socioambiental, São Paulo, 447 p.
- Stalpers JA. 1978. Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture. *Studies in Mycology* 16: 1–248.
- Setzer J. 1966. Atlas Climático e Ecológico do Estado de São Paulo. Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguai, 61p.
- Silveira RMB, Guerrero RT. 1991. Aphylophorales poliporóides (Basidiomycetes) do Parque Nacional de Aparados da Serra, RS. *Boletim do Instituto de Biociências* 48: 1–147.
- Silveira RMB, Reck MA, Graf LV, Nogueira De Sá F. 2008. Polypores from a Brazilian pine Forest in Southern Brazil: pileate species. *Hoehnea* 35(4): 619–630.
- Singer R. 1986. *The Agaricales in Modern Taxonomy*. 4th ed. Koenigstein: Koeltz Scientific Books. 981 p. + 88 pl
- Tomšovský M., Menkis A., Vasaitis R. 2010a. Phylogenetic relationships in European *Ceriporiopsis* species inferred from nuclear and mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Fung. Biol.* 114:350–358.
- Tomšovský M, Sedlák P, Jankovský L. 2010b. Species recognition and phylogenetic relationships of European *Porodaedalea* (Basidiomycota, Hymenochaetales). *Mycological Progress* 9(2): 225–233. doi: 10.1007/s11557-009-0628-y
- Tsujiyama S, Minami M. 2005. Production of phenol-oxidizing enzymes in the interaction between white-rot fungi. *Mycoscience* 46: 268-271.
- Vanini AE, Rodrigues RR. 2003. Caracterização silvigênica em uma formação pioneira com influência marinha no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia – SP. Pp. 180–182. In: Congresso de Ecologia do Brasil 6. Anais. Fortaleza: Editora da Universidade Federal do Ceará
- Veloso HP, ALR Rangel Filho, JCA Lima. 1991. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: IBGE.
- Vibrans AC, Sevegnani L, Uhlmann A, Schorn LA, Sobral MG, Gasper AL, Lingner DV, Brogni E, Klemz G, Godoy MB, Verdi M. 2011. Structure of mixed ombrophylous

- forests with *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) under external stress in Southern Brazil. *Revista de Biología Tropical* 59 (3): 1371–1387.
- Wan XZ, Yuan HS. 2013. Hydneous fungi of China 5. *Steccherinum* (Basidiomycota, Meruliaceae) in China. *Mycosystema* 32(6): 1086-1096.
- Westphalen MC, Reck MA, Silveira RMB. 2010. Polypores from Morro Santana, Rio Grande do Sul, Brazil. *Hoehnea* 37(3): 645–661.
- Westphalen MC, Reck MA, Silveira RMB. 2012. The Genus *Junghuhnia* in Brazil. *Nova Hedwigia* 94: 209–220.
- Yuan HS. 2012. *Antrodiella chinensis* sp. nov., a Chinese representative of the *Antrodiella americana* complex. *Mycological Progress*: 1–7 (online).
- Yuan HS. 2013. Molecular phylogenetic evaluation of *Antrodiella* and morphologically allied genera in China. *Mycological Progress* 1-12. doi: 10.1007/s11557-013-0921-7.
- Yuan HS, Li J, Huang MY, Dai YC. 2006. *Antrodiella stipitata* sp. nov. from Heilongjiang Province, northeast China, and a critical checklist of polypores from the area. *Cryptogamie Mycologie* 27(1): 21–29.
- Yuan HS, Dai YC. 2008. Two new species of *Junghuhnia* (Basidiomycota, Polyporales), and a key to the species of China. *Nordic Journal of Botany* 26: 96–100.
- Yuan HS, Dai YC. 2009. A Species of *Junghuhnia* (Basidiomycota, Polyporales) New to China. *Guizhou Science* 27(1): 26–27.
- Yuan HS, Quin WM. 2012. *Antrodiella pendulina* and *A. citripileata* spp. nov. (*Basidiomycota, Polyporales*) from subtropical and tropical China. *Nordic Journal of Botany* 29: 1–5.
- Yuan HS, Dai YC, Wu SH. 2012. Two new species of *Junghuhnia* (Polyporales) from Taiwan and a key to all species known worldwide of the genus. *Sydowia* 64 (1): 137–145.
- Zmitrovich IV, Malysheva VF, Spirin WA. 2006. A new morphological arrangement of the Polyporales. I. Phanerochaetinae. *Mycena*. 6:4-56

ANEXO I

- Imagens das espécies identificadas -



Antrodiella duracina



Antrodiella aff. *semisupina*



Antrodiella sp.



Aff. *Flaviporus subhydrophilus*



Cordiana carneola



Cordiana davidii



Flaviporus brownii



Flaviporus liebmannii



Flaviporus minutus



Flaviporus subundatus



Junghuhnia cf. semisupiniformis



Loweomyces spissus



Loweomyces tomentosus



Rickiopora latemarginata



Steccherinum neonitidum



Steccherinum undigerus



Steccherinum polycystidiferum



Tyromyces aff. *fumidiceps*