



BLEND A NAARA SANTOS DA SILVA

**SELEÇÃO DE FUNGOS APODRECEDORES DE
MADEIRA E CARACTERIZAÇÃO DE
BASIDIOMICETOS ASSOCIADOS À PODRIDÃO
DE TECIDOS DE ÁRVORES VIVAS**

LAVRAS – MG

2014

BLEND A NAARA SANTOS DA SILVA

**SELEÇÃO DE FUNGOS APODRECEDORES DE MADEIRA E
CARACTERIZAÇÃO DE BASIDIOMICETOS ASSOCIADOS À
PODRIDÃO DE ÁRVORES VIVAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitopatologia, área de concentração em Patologia Florestal, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Maria Alves Ferreira

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Silva, Blenda Naara Santos da.

Seleção de fungos apodrecedores de madeira e caracterização de
basidiomicetos associados à podridão de tecidos de árvores vivas /

Blenda Naara Santos da Silva. – Lavras : UFLA, 2014.

92 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Maria Alves Ferreira.

Bibliografia.

1. Fungos de podridão. 2. Perda de massa. 3. ITS. 4. Análise
filogenética. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.964

BLENDA NAARA SANTOS DA SILVA

**SELEÇÃO DE FUNGOS APODRECEDORES DE MADEIRA E
CARACTERIZAÇÃO DE BASIDIOMICETOS ASSOCIADOS À
PODRIDÃO DE ÁRVORES VIVAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitopatologia, área de concentração em Patologia Florestal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de setembro de 2014.

Dr. Hudson Teixeira	EPAMIG
Dr. Sebastião Carlos da Silva Rosado	UFLA
Dr. Sarah da Silva Costa Guimarães	UFLA

Dra. Maria Alves Ferreira
Orientadora

LAVRAS – MG

2014

*Ao meu pai e meu protetor Oto Gil (in memoriam). Ensinou-me que a sabedoria
é algo que ninguém pode nos tirar, diferente de todo o resto.
A minha mãe, Maria Rita, exemplo de humildade e força, pelo impulso e
coragem dado nessa caminhada longe de casa.
Ao meu irmão Grignard, minha prima Nilceana e minha amada filha Ester pelo
amor e carinho incondicional.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos.

À professora Dra. Maria Alves pela orientação, paciência e ensinamentos de valiosa importância para esse trabalho; sou extremamente grata.

Aos professores Dr. Vicente Paulo e Dr. José Machado por permitirem a utilização e condução de experimentos nos laboratórios de Nematologia e Sementes Florestais da UFLA.

Ao professor Acelino Alfenas por permitir a condução do experimento em nível molecular no laboratório de Patologia Florestal da UFV.

Aos colegas da UFV Mara e Lúcio pela paciência de repassar todos os ensinamentos necessários à condução da etapa realizada no laboratório de Patologia Florestal.

Às colegas de laboratório Abigail, Noemi, Renata, Lívia, Thaissa e Gizeli pela preciosa ajuda na condução dos experimentos.

Ao Júlio Carlos, pela ajuda em diversas etapas deste trabalho e pelo companheirismo, carinho e amizade.

RESUMO

Fungos de podridão são importantes organismos atuantes na degradação da madeira, devido ao seu aparato enzimático capaz de decompor os componentes químicos desse substrato e, por isso, esses fungos têm sido usados para diversos fins biotecnológicos. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi selecionar fungos de podridão por meio de ensaio de apodrecimento acelerado, coletado a partir de troncos e toras de madeira, e contribuir com informações morfológicas e moleculares da região ITS do rDNA sobre algumas espécies de três gêneros de fungos basidiomicetos coletados em Minas Gerais. Os fungos foram testados quanto à capacidade de produção de fenoxidase em meio acrescido de ácido tânico. O ensaio de biodegradação foi realizado a partir da adaptação das normas da ASTM D2017-05 e a identificação molecular dos fungos foi realizada por comparação com as sequências de ITS depositadas no GenBank. A caracterização morfológica e molecular dos isolados de *Ganoderma*, *Perenniporia* e *Rigidoporus* foi feita a partir de observações do basidioma e das colônias fúngicas. Todos os fungos testados causaram perda de massa, porém os que mais se destacaram foram *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus crinitus*, *Schizophyllum commune*, *Ganoderma* sp, *Gymnopilus lepidotus* e *Ganoderma subamboinense*. Os caracteres morfológicos e análise filogenética possibilitaram a identificação das espécies *G. subamboinense*, *G. parvulum*, *P. martia* e *R. ulmarius*.

Palavras-chave: Fungos saprofitos. Podridão de madeira. Análise filogenética. *Ganoderma* spp., *Perenniporia martia*. *Rigidoporus ulmarius*.

ABSTRACT

Rot fungi are important organisms that act in wood degradation due to its enzymatic apparatus capable of decomposing the chemical components of this substrate and, thus, these fungi have been used for several biotechnological purposes. Thus, the objective of this work was to select rot fungi by means of accelerated rotting trials, collected from wood trunks and logs, and to contribute with morphological and molecular information of the ITS region of the rDNA over a few species of three basidiomycete fungi genera collected in Minas Gerais, Brazil. The fungi were tested regarding its capacity for producing phenoloxidase in medium supplemented with tannic acid. The biodegradation trial was performed from the adaptation of the ASTM D2017-05 norms and the molecular identification of the fungi were performed by comparing the sequences of ITS deposited in the GenBank. The morphological and molecular characterization of the *Ganoderma*, *Perenniporia* and *Rigidoporus* isolates was done from observations of the basidioma and fungal colonies. All tested fungi caused mass loss, however, the *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus crinitus*, *Schizophyllum commune*, *Ganoderma* sp., *Gymnopilus lepidotus* and *Ganoderma subamboinense* were highlighted. The morphological traits and phylogenetic analysis allowed the identification of the *G. subamboinense*, *G. parvulum*, *P. martia* and *R. ulmarius* species.

Keywords: Saprophytic fungi. Wood rot. Phylogenetic analysis. *Ganoderma* spp. *Perenniporia martia*. *Rigidoporus ulmarius*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Biodegradação da madeira	14
2.2 Basidiomycetes (Polyporales)	15
2.2.1 Gênero <i>Ganoderma</i>	16
2.2.1.2 Sistemática de <i>Ganoderma</i>	16
2.2.2 Gênero <i>Rigidoporus</i>	18
2.2.3 Gênero <i>Perenniporia</i>	19
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO 2	24
SELEÇÃO DE FUNGOS APODRECEDORES DE MADEIRA DE EUCALIPTO	24
1 INTRODUÇÃO	26
2 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Coleta e isolamento de fungos	29
2.2 Caracterização morfológica	31
2.3 Caracterização molecular dos isolados fúngicos	31
2.3.1 Extração de DNA	31
2.3.2 Amplificação e purificação dos produtos da PCR	32
2.3.3 Edição e alinhamento das sequências	33
2.4 Determinação da capacidade de produção de fenoxidase	34
2.4 Determinação da capacidade dos isolados fúngicos em causar a perda de massa em cavacos de eucalipto	34
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1 Identificação molecular e morfológica dos isolados fúngicos	37
3.2 Produção de fenoxidases	38
3.2 Capacidade dos isolados fúngicos causarem perda de massa	42
5 CONCLUSÕES	46

REFERÊNCIAS.....	47
CAPÍTULO 3.....	50
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FILOGENÉTICA DE BASIDIOMICETOS ASSOCIADOS À PODRIDÃO DA BASE E DO TRONCO DE ÁRVORES VIVAS.....	50
1 INTRODUÇÃO.....	52
2 MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 Coleta e isolamento de fungos	54
2.2 Caracterização morfológica	55
2.3 Crescimento micelial	55
2.4 Caracterização molecular	56
2.4.1 Extração de DNA.....	56
2.4.2 Amplificação e purificação dos produtos da PCR	57
2.4.3 Edição, alinhamento das sequências e análises filogenéticas	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1 Caracterização morfológica dos gêneros <i>Ganoderma</i> , <i>Perenniporia</i> e <i>Rigidoporus</i>	65
3.1.1 <i>Ganoderma</i>	65
3.1.2 <i>Perenniporia</i>	68
3.1.3 <i>Rigidoporus</i>	68
3.2 Crescimento micelial	70
3.2.1 <i>Ganoderma</i>	70
3.2.2 <i>Perenniporia</i>	72
3.2.3 <i>Rigidoporus</i>	73
3.3 Análise filogenética.....	74
3.3.1 <i>Ganoderma</i>	74
3.3.2 <i>Perenniporia</i>	77
3.3.3 <i>Rigidoporus</i>	80
5 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	82
ANEXO.....	86

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A decomposição da madeira de forma eficiente se deve principalmente aos fungos, devido ao seu aparato enzimático capaz de degradar macromoléculas transformando-as em moléculas menores. São também, os maiores responsáveis por perdas após a colheita de madeira nas indústrias, principalmente, quando a finalidade do produto é para seu uso sólido.

Devido a sua grande diversidade, os fungos são capazes de crescer em locais variados agindo na árvore viva ou na matéria-prima confeccionada em tora de madeira tratada ou não tratada com produtos químicos. Apesar de causarem danos na indústria madeireira, o conhecimento dos efeitos promovidos pelas enzimas é de fundamental importância para aplicação desses fungos em processos industriais como biopolpação, biorremediação, ensaios de resistência natural de madeiras, tratamento de efluentes, etc.

Ascomicetos e basidiomicetos já foram relatados na literatura causando doenças e perdas em espécies florestais, porém dentro dos basidiomicetos concentram-se os maiores degradadores de madeira, tais como *Trametes versicolor* e *Gloeophyllum trabeum*, considerados representantes eficientes desse grupo. Fungos causadores de podridão da madeira são amplamente estudados, desde sua evolução filogenética, baseadas nas sequências das regiões do genoma (Internal transcribed spacer - ITS, mitochondrial small subunit – mtSSU, large subunit - LSU e outras) até suas propriedades enzimáticas com estudos sobre moléculas, colonização e degradação dos componentes da madeira (CALONEGO et al., 2013; CUI et al., 2011; GEOFFREY et al., 2007; MOHAMAD; ONG; RIPEN, 2008; TOMŠOVSKÝ et al., 2006).

No Brasil existe uma grande biodiversidade microbiológica devido às condições ambientais e seu vasto território. Desse modo, há várias espécies fúngicas no Brasil que ainda não são conhecidas ou não foram estudadas, por isso estudos sobre seleção de espécies fúngicas com maior habilidade de degradação podem ser feitos com o intuito de ampliar o leque de pesquisas sobre resistência de madeira. Basidiomicetos ocorrem em tocos e galhos em decomposição, porém muitos deles podem ser considerados como patógenos e, ou apodrecedores de madeira, como por exemplo, o fungo *Ganoderma* spp. que tem sido encontrado em associação à podridão da base e do tronco de diversas espécies arbóreas, tanto nativas como exóticas, tais como àquelas utilizadas na arborização urbana.

Com isso, o presente estudo possui duas abordagens: (i) coletar, identificar, verificar e selecionar fungos em Minas Gerais, com o intuito de verificar a capacidade de causar perda de massa em ensaio de degradação acelerada; (ii) realizar a caracterização molecular e morfológica de algumas espécies de três gêneros de basidiomicetos associados à podridão da base e do tronco de espécies arbóreas vivas utilizadas na arborização urbana, como contribuição para estudos futuros com esses gêneros, que até o presente momento, foram pouco estudados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biodegradação da madeira

A madeira é um material orgânico, complexo e heterogêneo, suscetível à deterioração biológica (bactérias, fungos, insetos e xilófagos marinhos), física e química. Os fungos são, provavelmente, uma das causas mais comuns de degradação da madeira. Os fatores fundamentais para ocorrência de fungos na madeira são: temperatura, umidade e baixos teores de extrativos totais presentes na madeira (OLIVEIRA et al., 1986). No entanto a capacidade de deterioração dos componentes da madeira varia de acordo com o hospedeiro e os isolados fúngicos da mesma espécie. Essa variabilidade está relacionada ao complexo enzimático presente em cada espécie ou linhagem fúngica (MACHUCA; FERRAZ, 2001).

Os primeiros fungos que colonizam as árvores recém-abatidas são geralmente emboloradores e manchadores de madeira, que afetam essencialmente o seu aspecto visual (BLANCHETTE et al., 2000).

Na degradação dos constituintes estruturais da madeira ocorrem fungos que são classificados de acordo com a decomposição que causam: podridão branca e parda (causadas principalmente por basidiomicetos) e podridão mole (causada por ascomicetos) (BLANCHETTE et al., 2000).

Os fungos de podridão branca atuam na superfície da parede celular vegetal, são capazes de degradar seus três componentes (celulose, hemicelulose e lignina). Podem ocorrer de duas formas, a mais comum envolve a remoção simultânea de todos os componentes e a outra, menos frequente, envolve a remoção seletiva de lignina e polioses, mantendo a celulose praticamente intacta. A madeira atacada apresenta uma aparência esbranquiçada e se rompe facilmente no sentido das fibras (RYVARDEN, 1991). Dentre os grupos enzimáticos

produzidos por fungos de podridão branca estão a lacase e a fenoloxidase extracelular com importante papel na degradação da lignina (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008).

Os fungos de podridão parda degradam a superfície da parede celular, principalmente as frações polissacarídicas (celulose e hemicelulose) por ação enzimática e não-enzimática, causando a coloração pardo-escura, gerando um resíduo enriquecido em lignina, que se quebra facilmente em cubos, no sentido transversal ao das fibras vegetais (RYVARDEN, 2007).

Os fungos de podridão mole ou branda atuam e amolecem as superfícies das madeiras, devido à degradação da hemicelulose e celulose. Podem ainda degradar tanto os polissacarídeos quanto a lignina, porém em velocidades muito reduzidas. Produzem tipicamente cavidades, na camada S2 nas madeiras em ambientes aquáticos ou terrestres (RYVARDEN, 2007).

2.2 Basidiomycetes (Polyporales)

No filo Basidiomycota, está a ordem Polyporales e a subclasse Agaricomycetidae, composta por 23 famílias, 298 gêneros e mais de 1.800 espécies descritas, na qual estão inseridos fungos com características morfológicas bastante diversificadas (KIRK et al., 2008).

Fungos poroides possuem importantes membros que atuam na ciclagem de carbono e são os mais eficazes decompositores de madeira da biosfera (FLOUDAS et al., 2012). Muitos deles atuam como saprófitas agindo diretamente na decomposição da madeira, enquanto outros são patógenos causadores de podridão nos troncos de árvores vivas (BINDER et al., 2013). Três gêneros associados a árvores vivas serão abordados nos subtópicos abaixo, *Ganoderma*, *Rigidoporus* e *Perenniporia*.

2.2.1 Gênero *Ganoderma*

As espécies de *Ganoderma* podem ser saprófitas ou fitopatogênicas. As fitopatogênicas agem de diferentes maneiras, podendo explorar o hospedeiro enfraquecido, necessitando de grande quantidade de inóculo inicial para que a doença ocorra, culminando na podridão de raiz e caule numa variedade de angiospermas e gimnospermas (REES et al., 2007).

O gênero *Ganoderma* pertence à família *Ganodermataceae* (Aphyllophorales, Basidiomycetes), no qual estão incorporadas diversas espécies relatadas em vários hospedeiros. A ampla gama de hospedeiros faz desse patógeno um organismo altamente adaptável a uma extensa variedade de condições climáticas em grandes áreas geográficas. Estão amplamente distribuídos em regiões tropicais e subtropicais, no Norte e Sul da América, Europa e Ásia, especialmente na China, Japão e Coreia (MONCALVO; RYVARDEN, 1997).

Árvores infectadas podem sobreviver por vários anos, dependendo da espécie. Em experimento realizado por Fernando (2008) sobre a preferência de hospedeiros de *G. lucidum*, foi observado que *Cassia nodosa* e *Delonix regia* são menos suscetíveis ao fungo e sobrevivem de um a dois anos após a formação dos primeiros basidiocarpos, quando comparadas a *C. fistula* que pode morrer em seis meses após o aparecimento do primeiro sinal de presença do fungo.

2.2.1.2 Sistemática de *Ganoderma*

A família *Ganodermataceae* foi descrita em 1933 e abrange os fungos com himenióforo formado por vários poros, e caracterizados por basidiósporos de parede dupla, com parede interna ornamentada e externa lisa e hialina. Posteriormente, em 1981 foi introduzido o nome ordinal *Ganodermatales*.

Grandes variações nessa família resultaram na descrição de cerca de 400 espécies, sendo que, aproximadamente, dois terços estão classificados no gênero *Ganoderma* (SEO; KIRK, 2000).

Dezenas de espécies foram descritas dentro do gênero *Ganoderma* seguindo a classificação de Karsten (1881). Naquele tempo, a identificação de isolados era baseada em aspectos morfológicos, distribuição geográfica e especificidade por hospedeiro (RYVARDEN, 1994).

Contudo, as características morfológicas são subjetivas e sofrem variações devido a fatores climáticos, formas de cultivo e desenvolvimento genético natural dentro de cada espécie. Por conseguinte, o relato de espécies por esses métodos resultou em um grande número de sinonímias, sobreposições e taxonomia incerta. As espécies de *Ganoderma* foram consideradas altamente plásticas em relação ao seu fenótipo, e alguns taxonomistas passaram a ponderar as características morfológicas na identificação de espécie (RYVARDEN, 1994).

Embora as características fenotípicas possuam importância para identificação parcial dos isolados, uma classificação baseada unicamente em dados morfológicos e fisiológicos pode gerar muitos equívocos (RYVARDEN, 1994).

Em 1995, a taxonomia molecular da família *Ganodermataceae* foi realizada pela primeira vez. Os autores acreditavam que a maior parte da polêmica criada no passado em torno da sistemática de *Ganoderma* poderia ser esclarecida com a utilização de técnicas de biologia molecular, pelo emprego de novos caracteres taxonômicos e uso de métodos de classificação baseados filogeneticamente. Nas espécies de *Ganoderma*, a região ITS é altamente variável e por essa razão permite distinguir algumas espécies dentro de *Ganodermataceae*. Sabendo-se das variações dentro do gênero, estudos têm sido publicados usando ferramentas moleculares que procuram estabelecer e

distinguir relações taxonômicas entre espécies de *Ganoderma* (MONCALVO; WANG; HSEU, 1995a, 1995b).

2.2.2 Gênero *Rigidoporus*

Rigidoporus pertencente à família Meripilaceae (Poriales, Basidiomycetes) é um gênero cosmopolita, com aproximadamente 40 espécies descritas na literatura (KIRK et al., 2008). Espécies do gênero são capazes de causar podridão branca em folhosas e raramente em coníferas (RYVARDEN, 1991).

Em seringueira (*Hevea brasiliensis*), *R. microporus* é considerado um dos patógenos causadores de podridão mais destrutivos, relatado em vários países do Sudeste Asiático, Ásia Meridional e África. O ataque de fungos desse gênero pode resultar na morte substancial das árvores e perdas na produção do látex. O fungo forma uma manta micelial branca achatada que cresce e se estende rapidamente pelo solo na ausência de substrato de madeira. Em árvores vivas ou mortas, pode formar o corpo de frutificação que produz grande quantidade de basidiósporos (NANDRIS; NOCOLE; GEIGER, 1987; OGHENEKARO et al., 2014).

Os basidiocarpos do gênero *Rigidoporus* podem ser ressupinados ou pileados, anuais ou perenes, variando em tons de vermelho, laranja, rosa, amarelo-claro e ocre. Os basidiósporos geralmente são elipsoide-globosos e negativos em reação de Melzer (RYVARDEN, 1991).

Muitas espécies de *Rigidoporus* foram descritas apenas com caracteres morfológicos, porém nos últimos quatro anos, alguns trabalhos relacionam a morfologia com as sequências de DNA principalmente da região ITS. Oghenekaro et al. (2014) estudou a filogenia molecular utilizando as regiões genômicas ITS, LSU, β -tubulina e fator de alongação 1- α (*tef1*), que resultou na

separação de isolados de *R. microporus* em três clados distintos. De acordo com esses autores, somente com a região ITS foi possível diferenciar a espécie em três clados distintos (África, Ásia e América) e as cepas de *R. ulmarius* permaneceram fora dos clados, evidenciando ser uma espécie próxima, porém distinta.

2.2.3 Gênero *Perenniporia*

Perenniporia (Poliporales, Basidiomycetes) é um gênero cosmopolita, amplamente distribuído nos trópicos e subtropicais. A descrição do gênero se expandiu nos últimos 20 anos. Dentro do gênero encontram-se espécies conhecidas como lignocelulósicas (DECOCK; STALPERS, 2006).

A espécie tipo do gênero, *Perenniporia medula-panis*, foi estabelecida depois de constatar que *Polyporus unitus*, espécie tipo determinada por Murril foi reconhecida como sinonímia de *Boletus medulla-panis*, pois se tratava de uma espécie não pertencente ao gênero *Perenniporia*. Desse modo foi proposto manter a nomenclatura *Perenniporia* junto à espécie tipo adotada, *B. medula-panis* (DECOCK; STALPERS, 2006).

Robledo et al. (2009) investigaram a filogenia de *Perenniporia* spp. utilizando as regiões LSU e ITS do rDNA. Nesse estudo a diferenciação pelo sistema de hifas e morfologia dos basidiósporos foi determinada como recursos críticos para a definição de gêneros no complexo *Perenniporia*.

Zhao, Cui e Dai (2013) em estudo para inserção de novas espécies de *Perenniporia* na literatura, observaram por análise filogenética, que 31 espécies pertencentes ao *Perenniporia* “*senso lato*”, se separavam em sete clados distintos. Os grupos *P. ochroleuca*, *P. vicina*, *P. martia* e *P. subacida* formaram clados monofiléticos, que poderiam ser caracterizados como gênero diferente. No clado VII, estão inseridos *P. latissima* e *P. martia* estabelecidos como

Hornodermoporus por Teixeira (1993) para acomodar o complexo *P. martia*. Esse gênero é caracterizado por basidiocarpo pileado, hifas não ramificadas e basidiósporos oblongos elipsoides, truncados, ambos fortemente dextrinoides e com presença de cistidia (ZHAO; CUI; DAI, 2013).

REFERÊNCIAS

- BINDER, M. et al. Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. **Mycologia**, New York, v. 105, n. 6, p. 1350-1373, Dec. 2013.
- BLANCHETTE, R. A. A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Birmingham, v. 46, n. 3, p. 189-204, Oct. 2000.
- CALONEGO, F. W. et al. Comportamento do fungo de podridão parda *Gloeophyllum trabeum* na madeira de *Eucalyptus grandis* modificada termicamente. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 20, n. 3, p. 417-423, 2013.
- CUI, D. Z. et al. Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera based on internal transcribed spacer (ITS) and nearly complete mitochondrial small subunit ribosomal DNA (mt SSU rDNA) sequences. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 79, p. 18111-18121, Dec. 2011.
- DECOCK, C.; STALPERS, J. A. Studies in *Perenniporia*: *Polyporus unitus*, *Boletus medulla-panis*, the nomenclature of *Perenniporia*, *Poria* and *Physisporus*, and a note on European *Perenniporia* with a resupinate basidiome. **Taxon**, Utrecht, v. 3, p. 759-778, Aug. 2006.
- FERNANDO, K. M. E. P. The host preference of a *Ganoderma lucidum* strain for three tree species of Fabaceae family; *Cassia nodosa*, *Cassia fistula* and *Delonix regia*. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, Sri Lanka, v. 36, n. 4, p. 323-326, July 2008.
- FLOUDAS, D. et al. The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science**, New York, v. 336, n. 6089, p. 1715-1719, June 2012.
- GEOFFREY, D. et al. Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* alcohol oxidase, an extracellular source of H₂O₂ in brown rot decay of wood. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 19, p. 6241-6253, Oct. 2007.
- KARSTEN, P. A. Enumeratio Boletinearum et Polyporearum Fennicarum, systemate novo dispositarum. **Revue Mycologique Toulouse**, Paris, v. 3, p. 16-19, 1881.

KIRK, P. M. et al. **Dictionary of the fungi**. Surrey: CABI Publishing, 2008. 640 p.

MACHUCA, A.; FERRAZ, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 29, n. 6/7, p. 386-391, Oct. 2001.

MOHAMAD, S. B.; ONG, A. L.; RIPEN, A. M. Evolutionary trace analysis at the ligand binding site of laccase. **Bioinformation**, New Delhi, v. 2, n. 9, p. 369-372, June 2008.

MONCALVO, J. M.; RYVARDEN, L. **A nomenclature study of the Ganodermataceae Donk**. Devon: Synops Fungorum, 1997. 114 p.

MONCALVO, J. M.; WANG, H. H.; HSEU, R. S. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 12, p. 1489-1499, Dec. 1995a.

MONCALVO, J. M.; WANG, H. H.; HSEU, R. S. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the Internal Transcribed Spacers and 25S ribosomal DNA sequences. **Mycologia**, New York, v. 87, n. 2, p. 223-238, Mar./Apr. 1995b.

NANDRIS, D.; NOCOLE, M.; GEIGER, J. P. Root rot disease of rubber tree. **Plant Disease**, Quebec, v. 71, p. 296-306, 1987.

OGHENEKARO, A. O. et al. Molecular phylogeny of *Rigidoporus microporus* isolates associated with white rot disease of rubber trees (*Hevea brasiliensis*). **Fungal Biology**, New York, v. 118, n. 5/6, p. 495-506, Apr. 2014.

OLIVEIRA, A. M. F. et al. Agentes destruidores da madeira. In: LEPAGE, E. S. (Ed.). **Manual de preservação de madeiras**. São Paulo: IPT, 1986. v. 1, p. 99-278.

REES, R. W. et al. Effect of inoculum potential, shading and soil temperature on root infection of oil palm seedlings by the basal stem rot pathogen *Ganoderma boninense*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 56, n. 5, p. 862-570, June 2007.

ROBLEDO, G. L. et al. *Perenniporiella chaquenia* sp. nov. and further notes on *Perenniporiella* and its relationships with *Perenniporia* (Poriales, Basidiomycota). **Mycologia**, New York, v. 101, n. 5, p. 657-675, Sept./Oct. 2009.

RYVARDEN, L. Can we trust morphology in *Ganoderma*? In: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONFERENCE, 5.; SYSTEMATICS, PHYTOPATHOLOGY AND PHARMACOLOGY, 5., 1994, Taipei. **Proceedings...** Taipei: National Taiwan University, 1994. p. 19-24.

RYVARDEN, L. **Genera of Polypores nomenclature and taxonomy**. Oslo: Gronlands Grafiske, 1991. 373 p.

RYVARDEN, L. Where are all the polypores gone? In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 5., 2007, Recife. **Anais...** Recife: SBM, 2007. p. 236-241.

SEO, G. S.; KIRK, P. M. *Ganoderma*: nomenclature and classification. In: FLOOD, J.; HOLDERNESS, M. et al. (Ed.). ***Ganoderma* diseases of perennial crops**. Seoul: CABI, 2000. p. 3-22.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 116-124, dez. 2008. Suplemento.

TEIXEIRA, A. R. **Chave para identificação dos gêneros de Polyporaceae com base na morfologia do basidiocarpo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1993. 55 p.

TOMŠOVSKÝ, M. et al. Molecular phylogeny of European *Trametes* (Basidiomycetes, Polyporales) species based on LSU and ITS (nrDNA) sequences. **Nova Hedwigia**, Berlin, v. 82, n. 3/4, p. 269-280, Oct. 2006.

ZHAO, C. L.; CUI, B. K.; DAI, Y. C. New species and phylogeny of *Perenniporia* based on morphological and molecular characters. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 58, n. 1, p. 47-60, Jan. 2013.

CAPÍTULO 2

SELEÇÃO DE FUNGOS APODRECEDORES DE MADEIRA DE EUCALIPTO

RESUMO

Na área florestal, após a colheita de madeira, em muitos casos ocorre degradação por agentes bióticos, especialmente fungos dos filos Basidiomycota e Ascomycota, os quais atuam nas madeiras estocadas, podendo causar principalmente podridão branca e marrom, comprometendo, dessa forma sua qualidade e inviabilizando sua utilização para fins comerciais. O potencial de degradação dos fungos xilófagos é importante para diversos fins biotecnológicos, e por isso eses fungos têm sido estudados quanto à sua capacidade de decomposição, a fim de viabilizá-los para vários fins, como destoca biológica, sacarificação de biomassa e produção de etanol, bem como estudos de resistência da madeira e de seus subprodutos. Dessa maneira, com o presente trabalho, objetivou-se selecionar fungos coletados em Lavras, Minas Gerais, com maior capacidade de degradação de madeira de eucalipto, a fim de contribuir para pesquisas futuras, no âmbito da biodegradação e biotecnologia. Os fungos foram identificados por comparação com as sequências de ITS rDNA depositadas no GenBank. Trinta e oito isolados fúngicos foram testados quanto à capacidade de produção de fenoloxidasas em meio acrescido de ácido tânico. O ensaio de apodrecimento acelerado foi realizado por meio de adaptação das normas da ASTM D2017-05. Dos 39 fungos avaliados 35 tiveram sua identificação confirmada por meio da análise da região ITS. De 38 isolados fúngicos, somente cinco não produziram fenoloxidasas. Todos os fungos causaram perda de massa nos cavacos de madeira após 120 dias, entretanto os que se destacaram foram os isolados de *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus crinitus*, *Schizophyllum commune*, *Gymnopilus lepidotus*, *Ganoderma* sp, e *Ganoderma subamboinense*, com perdas variando de 9% a 21%.

Palavras-chave: Perda de massa. Fungos de podridão. Fenoloxidase.

SCREENING OF WOOD-ROTTING FUNGI FOR EUCALYPTUS

ABSTRACT

In forestry, after harvesting wood, in many cases, degradation occurs by biotic agents, especially fungi of the Basidiomycota and Ascomycota phylum, which act in stocked woods, and might cause mainly white and brown rot, thus compromising its quality and precluding its use for commercial purposes. The degradation potential of wood-rotting fungi are important for several biotechnological purposes and, therefore, these fungi have been studied regarding their decomposition capacity in order to make them feasible for various purposes, such as biological stump, biomass saccharification and ethanol production, as well as studies of wood resistance and its byproducts. Thus, with the present work, we aimed at selecting fungi with higher degradation capacity of eucalyptus wood, collected in Lavras, Minas Gerais, Brazil, in order to contribute to future research, within the biodegradation and biotechnology scope. The fungi were identified by comparison with the rDNA ITS sequences deposited in GenBank. Thirty-eight fungal isolates were tested regarding the capacity for producing phenoloxidasases in medium supplemented with tannic acid. The accelerated decay trial was conducted by means of adapting the ASTM D2017-05 norms. Of the 39 fungi evaluated, 35 had their identification confirmed by means of analyzing the ITS region. Of 38 fungal isolates tested, only five produced no phenoloxidasases. All fungi caused mass loss in wood chips after 120 days, however, the *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus crinitus*, *Schizophyllum commune*, *Gymnopilus lepidotus*, *Ganoderma* sp, and *G. subamboinense* were highlighted, presenting mass loss ranging from 9 to 21%.

Keywords: Weight loss. Wood decay. Phenoloxidasase.

1 INTRODUÇÃO

A degradação da madeira ocorre devido à atuação de fatores abióticos, intempéries ou variações das condições ambientais, e fatores bióticos, com a ação de bactérias, fungos e insetos capazes de digerir componentes do substrato lenhoso. Na biodegradação, a presença de polímeros naturais presentes nas células da madeira, serve como fonte de nutrição, metabolizada pelos organismos, em unidades digeríveis pela ação de sistemas enzimáticos (OLIVEIRA; TOMASELLO; SILVA, 2005).

A durabilidade natural da madeira é conferida pela resistência ao ataque de organismos xilófagos, assim como agentes físicos e químicos. Essa característica difere de uma espécie arbórea para outra devido aos componentes químicos e estruturais inerentes a cada indivíduo. Madeiras que apresentam alto grau de resistência natural são reconhecidas pela elevada valorização, conferindo ampla utilização, e conseqüentemente tornando-se mais demandadas no mercado.

Após a colheita florestal, em muitos casos, ocorre degradação pelos agentes bióticos, especialmente fungos dos filos Basidiomycota e Ascomycota, os quais atuam nas madeiras estocadas, causando principalmente podridão branca e marrom. A atuação desses fungos na madeira compromete a composição química, pois diminui a massa, reduz a resistência mecânica e capacidade acústica, modifica a cor natural, diminui o poder calorífico, aumenta a permeabilidade, e possibilita maior propensão ao ataque de insetos, comprometendo, dessa forma, a sua qualidade e inviabilizando sua utilização para fins tecnológicos (LEPAGE, 1986) exceto para fungos comestíveis.

Danos causados na madeira conferem a alguns fungos xilófagos alta capacidade de degradação, e por isso eles têm sido estudados quanto a sua capacidade de decomposição do material lenhoso para várias finalidades. Por

exemplo, a destoca biológica, utilizada em tocos e raízes remanescentes após a colheita florestal, acelera a decomposição desses tocos em plantios de *Eucalyptus* sp. e possibilita a diminuição dos custos com destoca mecânica e agressividade ao meio ambiente (ALONSO; SILVA; KASUYA, 2007). Produção de coquetéis enzimáticos para sacarificação de biomassa possibilita a quebra de componentes lignocelulósicos de difícil rompimento, tornando a biomassa mais acessível a outros tratamentos, e dessa forma auxilia na produção de etanol e branqueamento de polpa celulósica (FALKOSKI et al., 2013). Tratamento de efluentes e descontaminação ambiental, evita o acúmulo de resíduos com baixos níveis de degradação, com diminuição de compostos tóxicos durante o processo de descontaminação, uma vez que se trata de um processo natural, não necessitando de substâncias químicas (SOUZA; ROSADO, 2009).

Além da ampla utilização de fungos de podridão pelo mercado, sabe-se que no Brasil apenas 900 mil m³ de madeira incluindo moirões, postes e dormentes recebem tratamento no Brasil, enquanto que os Estados Unidos tratam 17 milhões de m³ de madeira (SILVA, 2006). Produtos oriundos da madeira, como painéis, por exemplo, apresentam características químicas que também são degradados por fungos xilófagos, diminuindo a qualidade do material e acarretando prejuízos, principalmente para o mercado de exportação.

As pesquisas com degradação de produtos e subprodutos da madeira são escassas. A maior parte dos ensaios de degradação acelerada são realizados na madeira com poucos isolados e muitas vezes com baixa eficiência. A variabilidade genética desses fungos não é levada em consideração, visto que o grau de degradação na madeira também pode ser alterado por diversos fatores ambientais. Dessa forma, é importante que estudos sejam realizados com fungos da região de interesse levando-se em consideração as características do ambiente em que esse fungo foi coletado.

Devido à ampla ação de fungos decompositores e à necessidade de estudos focados na agressividade de xilófagos, com o presente trabalho objetivou-se selecionar fungos com maior capacidade de degradação de madeira de eucalipto, a fim de contribuir para pesquisas futuras, no âmbito da biodegradação e biotecnologia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e isolamento de fungos

Foram coletados 38 fungos associados à madeira de árvores e tocos em decomposição, nos fragmentos florestais do campus da Universidade Federal de Lavras, Universidade Federal de Viçosa e nas imediações das cidades de Lavras e Silveirânia – MG (Tabela 1).

Tabela 1 Isolados fúngicos coletados em diferentes substratos nas cidades de Lavras, Silveirânia e Viçosa – MG, entre 2011 e 2014.

Código do isolado	Data de Coleta	Cidade/ Estado	Substrato
PD1	26/08/2011	Lavras, MG	<i>Eucalyptus</i> sp.
PD2	26/08/2011	Lavras, MG	<i>Eucalyptus</i> sp.
PD13	21/10/2011	Lavras, MG	*
PD14	21/10/2011	Lavras, MG	*
PD16	21/10/2011	Silveirânia, MG	*
PD17	21/10/2011	Silveirânia, MG	*
PD19	18/11/2011	Lavras, MG	*
PD20	12/12/2011	Lavras, MG	*
PD21	25/11/2011	Lavras, MG	*
PD25	07/12/2011	Lavras, MG	*
PD28	07/12/2011	Lavras, MG	*
PD29	07/12/2011	Lavras, MG	*
PD30	25/11/2011	Lavras, MG	*
PD35	26/03/2012	Lavras, MG	*
PD44	20/03/2013	Lavras, MG	<i>Delonix regia</i>
PD45	20/03/2013	Lavras, MG	<i>Delonix regia</i>
PD46	20/03/2013	Lavras, MG	<i>Delonix regia</i>
PD47	14/05/2013	Lavras, MG	<i>Cinnamom zelandicum</i>
PD48	14/05/2013	Lavras, MG	<i>Cinnamom zelandicum</i>
PD50	26/04/2013	Lavras, MG	<i>Cinnamom zelandicum</i>
PD51	26/04/2013	Lavras, MG	<i>Astronium fraxifolium</i>
PD52	26/04/2013	Lavras, MG	*

Tabela 1 continua

PD56	26/04/2013	Lavras, MG	*
PD57	19/04/2013	Lavras, MG	<i>Cinnamon zelandicum</i>
PD58	19/04/2013	Lavras, MG	<i>Cinnamon zelandicum</i>
PD60	19/04/2013	Lavras, MG	<i>Caesalpinia ferrea</i>
PD63	16/07/2013	Lavras, MG	*
PD65	21/11/2013	Lavras, MG	<i>Eucalyptus</i> sp.
PD66	21/11/2013	Lavras, MG	<i>Eucalyptus</i> sp.
PD67	21/11/2013	Lavras, MG	<i>Eucalyptus</i> sp.
PD68	21/11/2013	Lavras, MG	<i>Hevea brasiliensis</i>
PD69	04/02/2014	Lavras, MG	<i>Delonix regia</i>
PD70	17/03/2014	Viçosa, MG	<i>Delonix regia</i>
PD71	21/03/2014	Lavras, MG	<i>Cinnamon zelandicum</i>
PD72	21/03/2014	Lavras, MG	<i>Cinnamon zelandicum</i>
PD74	25/04/2014	Viçosa, MG	<i>Delonix regia</i>
PD75	25/04/2014	Viçosa, MG	<i>Delonix regia</i>
PD76	25/04/2014	Viçosa, MG	<i>Delonix regia</i>

Para o isolamento dos fungos, fragmentos das estruturas fúngicas foram retirados, desinfestados superficialmente em álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito 2% por 2 minutos, e submersos em água esterilizada duas vezes para eliminar o excesso de hipoclorito. Após a desinfestação superficial, os fragmentos foram transferidos para placa de Petri contendo Batata Dextrose Ágar (BDA Himedia®) e incubados a 26 °C por sete dias para crescimento das colônias. O armazenamento dos isolados foi realizado em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA, tubos de *ependorfs* contendo NaCl, pelo método de castellani, mantidos em temperatura ambiente e em tubos de *ependorfs* com glicerina 15% conservados a -80 °C.

2.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada a partir da observação das estruturas fúngicas no momento da coleta, e observação das colônias fúngicas crescidas em meio BDA 25 °C.

2.3 Caracterização molecular dos isolados fúngicos

2.3.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA, foram transferidos cinco discos de micélio de 7 mm para frascos contendo 200 mL de meio líquido (20 g de extrato de malte/ 1 L de água) mantido à temperatura de 28 °C por 15 dias. A massa micelial produzida após esse período foi filtrada, seca e mantida a -80 °C até o momento da extração.

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Patologia Florestal da UFV, utilizando Kit Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega, Madison, EUA) com modificações no protocolo de acordo com Valdetaro (2012).

Inicialmente transferiu-se o micélio para um tubo *ependorf* de 2 mL, contendo 200 µL de solução de lise dos núcleos e bolinha de chumbo, levado ao aparelho “Tissuelyser III” (Quiagen®) a 30 HZ por dois minutos. O macerado obtido foi incubado a -20 °C por cinco min a fim de ajudar na lise celular. Posteriormente, repetiu-se o processo anterior, porém acrescentou-se 400 µL de solução de lise dos núcleos, macerou-se no “Tissuelyser III” a 30 HZ por dois min, e incubou-se a 65 °C por 15 min, invertendo os tubos a cada cinco os. Em centrífuga (Eppendorf Microcentrifuge 5415R) as amostras permaneceram por cinco min a 13 000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido

para um novo *ependorf* de 1,5 mL e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 min. Após esse período, adicionou-se 300 µL de solução de precipitação de proteína. Os tubos foram invertidos cuidadosamente, e centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL onde foram adicionados 500 µL de Clorofórmio : Álcool Isoamílico (24:1) agitando-se cuidadosamente. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm durante cinco min e transferidas (fase superior) para um novo tubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol gelado e incubadas “overnight” a -20 °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 13.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet* remanescente, adicionou-se 600 µL de etanol gelado, agitou-se o tubo cuidadosamente e centrifugou-se a 13.000 rpm por cinco minutos. Essa etapa foi repetida três vezes afim de se obter DNA livre de impurezas. Após remover o etanol, os tubos foram deixados em posição horizontal com tampa aberta sobre papel toalha por 15 min para secagem do *pellet*. O DNA foi ressuscitado em 30 µL de solução de reidratação de DNA acrescido de 1 µL de solução de RNase e incubado a 65 °C por 10 min e, posteriormente 37 °C por cinco horas. O DNA obtido de cada isolado foi quantificado e a concentração ajustada para 10 ng µL⁻¹ utilizando-se o aparelho Nanodrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.).

2.3.2 Amplificação e purificação dos produtos da PCR

A amplificação e purificação do DNA genômico foi realizada no Laboratório de Patologia Florestal da UFV de acordo com o protocolo dos *kits* utilizados. Para amplificação utilizou-se *kit* Thermo Scientific Dream Taq PCR Master Mix® (2X). Os iniciadores utilizados foram os oligonucleotídeos ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE, 1990) para estudo da região ITS

(Internal Transcribed Spacer). A região foi amplificada usando termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®), com a seguinte reação 12,5 µL de Dream Taq PCR Master Mix 2x (0,4 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, e 4Mm de MgCl₂), 1,5 µL de cada *primer* diluído (1:10), 2 µL de DNA e 7,5 µL de água ultrapura para completar o volume final da reação de 25 µL.

A reação de PCR foi obtida nas seguintes condições: temperatura de desnaturação de 96 °C por cinco min, seguido de 35 ciclos 94 °C por 30s, 50 °C por 30s, e 72 °C por 90s e extensão final de 72 °C por quatro minutos.

Os produtos resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% a 80 V durante 60 min, contrastados em brometo de etídio 1%. O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado pelo uso do padrão de peso molecular de 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen®). Os géis foram fotografados pelo aparelho de fotodocumentação Loccus Biotecnologia Molecular Imaging Transilluminator. Os produtos da PCR foram purificados usando o Kit GFX™ PCR DNA® and Gel Band Purification® de acordo com o protocolo do fabricante e armazenados a -20 °C até o momento do sequenciamento.

2.3.3 Edição e alinhamento das sequências

Os fragmentos de DNA foram sequenciados nas direções senso e antissenso no Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa por eletroforese capilar em sequenciador automático MEGA BACE®. A edição dos eletroferogramas gerados foi realizada com o auxílio do programa SeqAssem versão 2007/2008. Sequências de referência correspondentes à região genômica do ITS foram comparadas com outras sequências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) pela ferramenta BLAST que mostra a porcentagem de similaridade dos isolados estudados em relação às sequências já depositadas no Genbank.

As espécies com maior similaridade foram confirmadas devido aos caracteres morfológicos observados previamente.

2.4 Determinação da capacidade de produção de fenoloxidase

A capacidade dos isolados de causar podridão em madeira foi determinada pelo teste de Bavendamm (DAVIDSON; CAMPBELL; BAISDELL, 1938), que permite observar a produção de oxidase celular como lacase, tirosinase e catecol oxidase (BURKE; CAIRNEY, 2002; SHLEEV et al., 2004).

Para isso, foram retirados das bordas de colônias com 8 - 10 dias de idade, discos de micélio com 7 mm de diâmetro, transferidos para placas de Petri contendo meio extrato de malte (15 g/L), ágar (20 g/L) e ácido tânico (5 g/L). As colônias foram avaliadas com 24, 48 horas e cinco dias após a incubação. Realizou-se a avaliação visual e quando houve formação de halo marrom, foi considerado como reação positiva para produção de fenoloxidasas. A análise qualitativa da produção de enzima foi realizada de acordo com Davidson, Campbell e Baisdell (1938). A cultura de *Pycnoporus sanguineus* (PS) foi empregada como controle positivo do teste de Bavendamm.

2.4 Determinação da capacidade dos isolados fúngicos em causar a perda de massa em cavacos de eucalipto

O teste de perda de massa foi conduzido nos Laboratórios de Nematologia e de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A madeira em cavacos do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* foi cedida pela empresa FIBRIA S.A.

Para o ensaio de degradação acelerada, foram utilizadas normas adaptadas da ASTM 2017 (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM, 2005). Inicialmente amostras de cavacos foram separadas para obtenção da massa seca inicial. Posteriormente os cavacos foram imersos em água e, após 24h, o excesso foi drenado. Amostras foram retiradas para determinação da densidade básica da madeira (SMITH, 1954). Em frascos de vidro foram colocados 85,37 g de solo sem matéria orgânica, com umidade previamente ajustada para 130% (ASTM, 2007), em seguida, 10 g \pm 1 de cavacos saturados foram acondicionados junto ao solo (Figura 1a). Os frascos foram fechados com papel alumínio e autoclavados a 121 kgf/cm³ durante 40 minutos. Após 24h, cinco discos de micélio de 7 mm de diâmetro, retirados das bordas de colônias cultivadas em BDA por 8 - 10 dias a 25 °C, foram transferidos assepticamente para o substrato contido no interior dos frascos. Posteriormente, os frascos foram fechados com auxílio de liga de borracha, 2 tecidos de 12 x 12 cm com poro de 30 μ m cada, e papel alumínio. Os frascos foram armazenados a 24 °C \pm 2 em umidificador de ar, no escuro, por 120 dias (Figura 1b e 1c).

Para avaliação do experimento, a massa micelial aderida aos cavacos foi retirada com o auxílio de escova de cerdas duras (Figura 1d). Após a limpeza, os cavacos foram acondicionados em sacos de papel devidamente identificados e colocados em estufa a 102 \pm 2 °C até obter massa constante para determinação da massa seca.

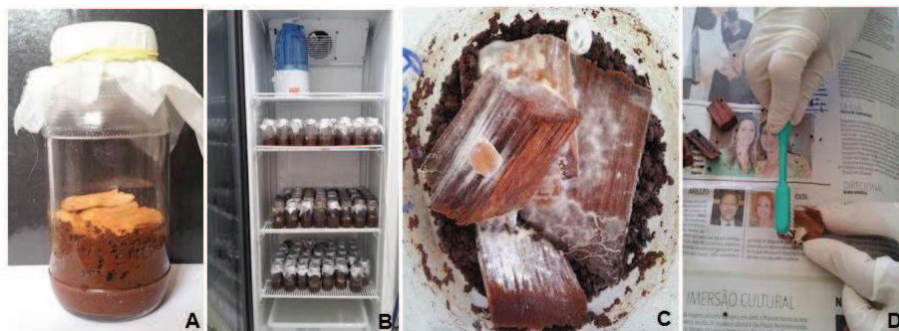


Figura 1 Teste ensaio de degradação acelerada. A) Acondicionamento dos cavacos sob o solo, B) Armazenamento dos recipientes por 120 dias, C) Crescimento fúngico nos cavacos de eucalipto e D) Limpeza dos cavacos.

Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e quatro repetições. Madeira não tratada com o fungo foi utilizada como controle negativo. Como controle positivo foi utilizado o fungo *P. sanguineus* (PS). Para análise dos dados foi utilizado o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011) e as médias calculadas pelo teste de Tuckey ($p < 0,05$). A perda de massa foi calculada em relação à testemunha, deste modo, garantiu-se que as perdas de massa causadas pelos fungos nos cavacos de madeira, foram resultantes exclusivamente do ataque fúngico (ALONSO; SILVA; KASUYA, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação molecular e morfológica dos isolados fúngicos

A identificação em nível de espécie foi possível para aqueles isolados fúngicos cujos caracteres morfológicos observados na coleta e nas colônias fúngicas crescidas em BDA corresponderam à identificação molecular realizada a partir da região ITS do DNA ribossomal (Tabela 2).

Os isolados PD19, PD25, PD57 e PD67 não foram identificados devido à baixa similaridade com as sequências depositadas no GenBank e sobreposição das sequências inviabilizando a identificação correta dos isolados.

Tabela 2 Identificação molecular dos isolados fúngicos por comparação com as sequências depositadas no GenBank utilizando-se a região ITS do DNA ribossomal.

Código do isolado	Gênero e/ou espécie	Similaridade (%) ¹
PD1	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	99
PD2	<i>Lentinus crinitus</i>	99
PD13	<i>Schizophyllum commune</i>	91
PD14	<i>Phanerochaete chysosporium</i>	98
PD16	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	99
PD17	<i>Schizophyllum commune</i>	98
PD19	*	-
PD20	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	99
PD21	<i>Schizophyllum commune</i>	99
PD25	*	-
PD28	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	100
PD29	<i>Schizophyllum commune</i>	99
PD30	<i>Xylaria curta</i>	99
PD35	<i>Scytalidium</i> sp.	91
PD44	<i>Ganoderma</i> sp.	90
PD45	<i>Ganoderma</i> sp.	90
PD46	<i>Ganoderma</i> sp.	98
PD47	<i>Xylaria</i> sp.	90
PD48	<i>Xylaria</i> sp.	99
PD50	<i>Gymnopilus lepidotus</i>	98
PD51	<i>Ganoderma subamboinense</i>	99

Tabela 2 continua.

PD52	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	98
PD56	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	100
PD57	*	-
PD58	<i>Ganoderma subamboinense</i>	99
PD59	<i>Arthrinium</i> sp.	98
PD60	<i>Ganoderma parvulum</i>	97
PD63	<i>Gloeophyllum abietinum</i>	86
PD65	<i>Stereum hirsutum</i>	95
PD66	<i>Lentinus bertieri</i>	94
PD67	*	-
PD68	<i>Trametes elegans</i>	99
PD69	<i>Ganoderma parvulum</i>	97
PD70	<i>Ganoderma</i> sp.	97
PD71	<i>Perenniporia martia</i>	100
PD72	<i>Perenniporia martia</i>	98
PD74	<i>Ganoderma</i> sp.	97
PD75	<i>Rigidoporus ulmarius</i>	100
PD76	<i>Rigidoporus ulmarius</i>	99

¹ Porcentagem de similaridade com os isolados depositados no Genbank[®].

* Não foi possível fazer a identificação em nível de gênero ou espécie.

3.2 Produção de fenoloxidasas

Foram testados 38 isolados fúngicos quanto à produção de fenoloxidase (Tabela 3) e considerados positivos quando houve difusão de halo ao redor do crescimento micelial, variando de coloração marrom claro ao marrom escuro (Figura 2).

A difusão da zona marrom pela colônia fúngica é resultado da oxidação do ácido tânico, decorrente da presença de fenoloxidase, no aparato enzimático do fungo. A oxidação desse substrato é mediada por pelo menos três fenoloxidasas, incluindo catecol oxidase, lacase e tirosinase, no entanto não indica especificamente qual atividade enzimática está envolvida (BURKE; CAIRNEY, 2002). A reação de Bavendamm para Basidiomicetos, em geral mostra a produção de lacase e tirosinase (SHLEEV et al., 2004).

A lignina pode ser degradada por várias enzimas, contudo dentro do grupo fenoloxidase, a presença de lacase no aparato enzimático do fungo, revela uma característica essencial para degradação de madeira (BLANCHETTE, 1998).

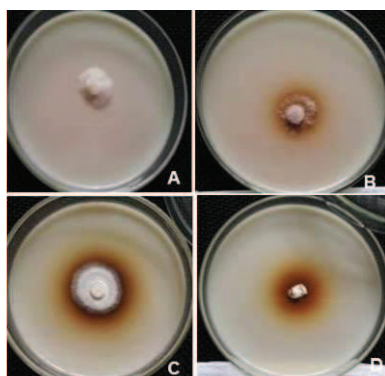


Figura 2 Expressão da atividade enzimática dos fungos PD30 (A), PD35 (B), PD44 (C) e PD46 (D) cultivados em meio malte acrescido de 5% de ácido tânico. O isolado PD30 foi negativo para produção de fenoloxidase.

Tabela 3 Análise qualitativa e quantitativa de produção enzimática por fungos ascomicetos e basidiomicetos isolados em Silveirânia, Lavras e Viçosa – MG.

Cód. do isolado	Gênero/Espécie	Fenoloxidase
PD1	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	+++
PD2	<i>Lentinus crinitus</i>	+++
PD13	<i>Schizophyllum commune</i>	++
PD14	<i>Phanerochaete chysosporium</i>	-
PD16	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+++
PD17	<i>Schizophyllum commune</i>	++
PD20	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	++
PD21	<i>Schizophyllum commune</i>	+++
PD25	*	+++
PD28	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+++
PD29	<i>Schizophyllum commune</i>	++
PD30	<i>Xylaria curta</i>	-
PD35	<i>Scytalidium</i> sp.	+++
PD44	<i>Ganoderma</i> sp.	+++++
PD45	<i>Ganoderma</i> sp.	+++++
PD46	<i>Ganoderma</i> sp.	+++++

Tabela 3 continua.

PD47	<i>Xylaria</i> sp.	+++
PD48	<i>Xylaria</i> sp.	+++
PD50	<i>Gymnopilus lepidotus</i>	-
PD51	<i>Ganoderma subamboinense</i>	++++
PD52	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+++
PD56	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+++
PD58	<i>Ganoderma subamboinense</i>	++++
PD59	<i>Arthrimum</i> sp.	-
PD60	<i>Ganoderma parvulum</i>	++++
PD63	<i>Gloeophyllum abietinum</i>	-
PD65	<i>Stereum hirsutum</i>	+++
PD66	<i>Lentinus bertieri</i>	++
PD67	*	++
PD68	<i>Trametes elegans</i>	+
PD69	<i>Ganoderma parvulum</i>	++++
PD70	<i>Ganoderma</i> sp.	+++
PD71	<i>Perenniporia martia</i>	++
PD72	<i>Perenniporia martia</i>	+++
PD74	<i>Ganoderma</i> sp.	++++
PD75	<i>Rigidoporus ulmarius</i>	++
PD76	<i>Rigidoporus ulmarius</i>	++
PS	<i>P. sanguineus</i>	++++

Intensidade visual da produção de enzima: - não produziu ... ++++ produziu muito

Com um a dois dias, 87% dos isolados fúngicos foram capazes de produzir fenoloxidase. Na maior parte das reações, houve coloração máxima após 24h, exceto o isolado fúngico PD17 na qual a presença de halo foi observada somente após cinco dias.

A diferença de dias para início da produção de fenoloxidase pelos isolados PD17, PD13, PD21 e PD29, identificados como *Schizophyllum commune*, assim como oxidase observada com coloração mais escura pelo PD21, possivelmente se deve à variabilidade genética intraespecífica dos fungos.

Os isolados PD13, PD17, PD29, PD20 e PD57 não produziram halo ao redor da colônia fúngica, porém apresentaram reação de oxidase abaixo da colônia com coloração marrom escuro. Os isolados PD2, PD35, PD65, PD66, PD75 e PD76 apresentaram produção média de fenoloxidase.

Os isolados PD46, PD58 e PD68 apresentaram atividade enzimática, no entanto, não houve crescimento fúngico no meio de cultura, apresentando halo marrom escuro a marrom claro. Isso ocorre, provavelmente, devido ao efeito tóxico do ácido agindo na hifa fúngica e inibindo seu crescimento micelial (DAVIDSON; CAMPBELL; BAISDELL, 1938).

Os melhores resultados foram observados para as espécies de *Ganoderma* spp. (PD44, PD45, PD46 e PD58) e *Perenniporia martia* (PD71 e PD72) que, visualmente, apresentaram maior produção de fenoloxidase com presença de halo marrom escuro ao redor e abaixo das colônias. Kumari e Sirsi (1972) observou que culturas de *G. lucidum* são capazes de oxidar componentes típicos da atividade de lacase, também estudado por Manavalan et al. (2013) que verificou a produção de lacase em quantidade significativamente maior por *G. lucidum* em relação à *Pycnoporus cinnabarinus*. Pointing et al. (2005) constataram que a espécie *Perenniporia medula-panis* possui o gene específico de lacase, atividade enzimática já evidenciada na literatura por Machuca e Ferraz (2001).

Não houve oxidação do ácido tânico por cinco fungos testados, sendo eles PD14 (*P. chrysosporium*), PD30 (*Xylaria* sp.), PD50 (*Gymnopilus lepidotus*), PD59 (*Arthrimum* sp.) e PD63 (*Gloeophyllum abietinum*).

O isolado PD14 não apresentou crescimento no meio com ácido tânico nem halo de oxidação. Isso ocorre porque a espécie de podridão branca *P. chrysosporium*, muito estudada por sua capacidade de degradar todos os componentes da madeira, não produz fenoloxidase para decompor a lignina, ou seja, conta apenas com as lignases: manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiPs) (DASHTBAN et al., 2010).

Dentro do gênero *Gymnopilus* as espécies têm sido reportadas como fungos de podridão branca e marrom, apesar de nem todos terem habilidade de degradar lignina, todas as espécies desse grupo são ótimos degradadores de

celulose (FAUSTO-GUERRERA; GUZMÁN-DÁVALOS; VELÁZQUEZ-HUESO, 2002).

Ascomicetos em sua maioria são capazes de degradar celulose e hemicelulose, porém a habilidade de degradar lignina é limitada (MARTINEZ et al., 2005), contudo Pointing et al. (2005) relataram que os ascomicetos *Xylaria* sp. e *Hypoxyllum* sp. possuem o gene específico da lacase, assim como os basidiomicetos. Entre os ascomicetos estudados a atividade fenolítica foi constatada em todas as espécies, exceto em *Xylaria* sp. e *Arthrimum* sp.

3.2 Capacidade dos isolados fúngicos causarem perda de massa

Foram feitas 128 observações no teste de degradação acelerada (Figura 3), com maior perda de massa causada pelo isolado de *P. sanguineus*, fungo utilizado como controle positivo. A testemunha negativa apresentou perda de 2,73 a 3,25 g de massa. Desse modo, o cálculo da perda de massa foi feito em relação à testemunha, assim a testemunha foi considerada igual à zero.

O híbrido *E. urograndis* x *E. urophylla* apresentou densidade básica de 0,620 g/cm³, em acordo com o clone do mesmo híbrido de maior densidade avaliado por Santos e Sansígolo (2007) com 0,680 g/cm³. Nessa densidade, os autores observaram presença de 30% de lignina, 4% de extrativos e 67% de holocelulose. A densidade é um dado importante na correlação com a perda de massa, madeiras de alta densidade apresentam teores maiores de extrativos e lignina, e componentes químicos que retardam o crescimento fúngico no substrato de madeira, diferente das madeiras de baixa densidade.

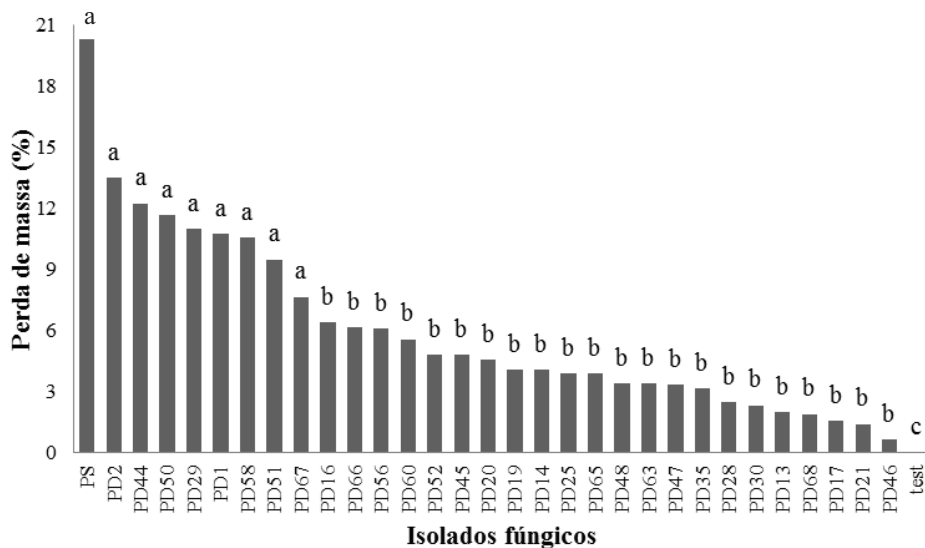


Figura 3 Perda de massa em porcentagem causada pelos isolados fúngicos. Teste Scott-Knott ao nível de 5%, CV= 3,74%. Valores seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente.

As maiores perdas de massa foram constatadas pelos isolados *P. sanguineus* (PS e PD1) com perdas de 20,5% e 10,8%, *Lentinus crinitus* (PD2) com 13,5%, *S. commune* (PD29) com 11%, *Ganoderma* sp. (PD44) com 12,3%, *G. lepidotus* (PD50) com 12% e *G. subamboinense* (PD58 e PD51) com 11% e 9,5%, respectivamente.

Oliveira, Tomasello e Silva (2005) ao testar a degradação causada por *G. trabeum* em madeira de *Eucalyptus* sp. durante 120 dias observaram valores entre 0,5 e 4,6% para *E. grandis* e *E. citriodora*, respectivamente. Melhores resultados foram obtidos por Alonso, Silva e Kasuya (2007) que após corrigir a relação C/N afim de obter condições ideais para biodegradação dos cavacos testados, obtiveram perdas de massa de 25,6% (*Perenniophora* sp), 23,9%, 16,8% e 14,4% (*P. sanguineus*), 23,8% (*Pestalotiopsis* sp), 21,9% (*Ganoderma* sp.) e 12,5% (*T. versicolor*).

A diferença de perda de massa entre os isolados de *P. sanguineus* (PS e PD1) possivelmente se deve ao complexo enzimático inerente a cada fungo, uma vez que a capacidade de degradação biológica dos componentes da madeira varia entre isolados fúngicos de mesma espécie (MACHUCA; FERRAZ, 2001). Diferença também observada em isolados *P. sanguineus* com perdas de massa variando em 23,9%, 16,8% e 14,4% foram observadas por Alonso, Silva e Kasuya (2007). Os isolados de *S. commune* também apresentaram diferença de perda de massa de 11%, 2%, 2% e 1,5% observada entre os isolados fúngicos PD29, PD13, PD17 e PD21, respectivamente.

Abreu et al. (2007) verificaram que em disco de madeira de *Eucalyptus* sp., *S. commune* promoveu perda de massa de 9,1%, valor similar ao encontrado neste trabalho com o isolado PD26 (11%), também similar ao fungo *S. commune* coletado na Indonésia, testado em *E. pellita*, considerada como madeira resistente, com perda de 11,3% (SUPRAPTI et al., 2010). Apesar de serem cepas isoladas em diferentes regiões, o ataque a madeira depende principalmente da estirpe fúngica (PILDAIN; NOVAS; CARMARÁN, 2005).

Os cavacos de madeira testados com *L. crinitus* (13,5%) e *L. bertieri* (6,16%) apresentaram perdas de massa com diferença significativa entre si, assim como Negrão et al. (2014) que obteve perdas de 29,1% e 10,6% respectivamente em *L. bertieri* e *L. edodes* testadas durante 120 dias no híbrido urograndis com umidade do solo ajustada para 100%.

Os isolados de *Ganoderma* (PD44, PD51 e PD58) observados com maiores valores variaram entre 12,2% e 9,5%. Morais e Costa (2007), ao avaliarem a alteração de cor aparente das madeiras de *E. camaldulensis* e *E. pillularis* após tratamento com o fungo *G. applanatum*, relataram que a perda de massa foi avaliada em 6,6% e 4,7%, respectivamente.

A perda de massa e a oxidação do ácido tânico, não mostraram correlação direta. Uma vez que, os isolados que apresentaram, visualmente,

maior atividade de fenoxidase, PD44 e PD58, causaram perda de massa menor que os isolados com atividade média da enzima (PS e PD2), no entanto não houve diferença estatística entre esses isolados no teste de perda de massa. Além disso, o isolado PD50, negativo no teste de Bavendamm, também apresentou valores altos de perda em relação aos outros isolados dentro do grupo A (PD29, PD1, PD58 e PD51). Shleev et al. (2004) também verificaram que o Teste de Bavendamm não demonstrou ligação direta positiva com a dinâmica de oxidase, durante o cultivo submerso de basidiomicetes. Os autores verificaram que as cepas com maior atividade de oxidase mostraram menores níveis na reação de Bavendamm.

A diferença entre perda de massa e reação de Bavendamm observada nesse estudo possivelmente se deve à presença de outras enzimas agindo na degradação da madeira e do próprio substrato. O crescimento e fermentação do fungo em meio sólido é diferente daquele que ocorre em outros substratos, e consequentemente a produção de enzimas (MACHUCA; FERRAZ, 2001).

5 CONCLUSÕES

Os isolados fúngicos com maior capacidade de degradação sobre os cavacos de madeira, testados em ensaio de perda de massa acelerada foram: *P. sanguineus*, *L. crinitus*, *S. commune*, *Ganoderma* sp, *G. lepidotus* e *G. subamboinense*.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. D. et al. Degradação da madeira de *Eucalyptus* sp. por basidiomicetos de podridão branca. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 4, p. 321-328, out./dez. 2007.

ALONSO, S. K.; SILVA, A. G.; KASUYA, M. C. M. Isolamento e seleção de fungos causadores da podridão branca da madeira em florestas de *Eucalyptus* spp. com potencial de degradação de cepas e raízes. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 1, p. 145-155, jan./fev. 2007.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D1413-07: standard test method for wood preservatives by laboratory soil-block cultures. **ASTM Standards**, Philadelphia, v. 4.10, n. 1, p. 1-8, Apr. 2007.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D2017-05: standard test method of accelerated laboratory test of natural decay resistance of woods. **ASTM Standards**, Philadelphia, v. 7.6, n. 1, p. 1-8, Oct. 2005.

BLANCHETTE, R. A. A review of microbial deterioration found in archeological wood from different environments. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Birmingham, v. 46, n. 3, p. 184-204, Apr. 1998.

BURKE, R. M.; CAIRNEY, J. W. G. Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 12, n. 3, p. 105-116, June 2002.

DASHTBAN, M. et al. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Madison, v. 1, n. 1, p. 36-50, Mar. 2010.

DAVIDSON, W. R.; CAMPBELL, W. A.; BAISDELL, D. J. Differentiations of wood-decaying fungus by their reactions on gallic or tannic acid medium. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 59, p. 683-695, 1938.

FALKOSKI, D. L. et al. *Chrysosporthe cubensis*: a newsource of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 130, n. 1, p. 296-305, Dec. 2013.

FAUSTO-GUERRA, S.; GUZMÁN-DÁVALOS, L.; VELÁZQUEZ-HUESO, J. C. Cultural studies of *Gymnopilus* species (Cortinariaceae, Agaricales). **Mycotaxon**, Ithaca, v. 84, n. 1, p. 429-444, Oct./Dec. 2002.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

KUMARI, H. L.; SIRSI, M. Purification and Properties of Laccase from *Ganoderma lucidum*. **Archives in Mikrobiology**, London, v. 84, p. 350-357, 1972.

LEPAGE, E. S. **Manual de preservação de madeiras**. São Paulo: IPT, 1986. v. 1, 342 p.

MACHUCA, A.; FERRAZ, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 29, n. 6/7, p. 386-391, Oct. 2001.

MANAVALAN, T. et al. Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 106-114, Jan. 2013.

MARTINEZ, A. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, Madrid, v. 8, n. 3, p. 194-204, May 2005.

MORAIS, F. M.; COSTA, A. F. Alteração da cor aparente de madeiras submetidas ao ataque de fungos apodrecedores. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, n. 1, p. 44-50, jan./mar. 2007.

NEGRÃO, D. R. et al. Biodegradation of *Eucalyptus urograndis* wood by fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 89, n. 1, p. 95-102, Apr. 2014.

OLIVEIRA, J. T.; TOMASELLO, M.; SILVA, J. C. Resistência natural da madeira de sete espécies de *Eucalipto* ao apodrecimento. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 6, p. 993-998, nov./dez. 2005.

PILDAIN, M. B.; NOVAS, M. V.; CARMARÁN, C. C. Evaluation of anamorphic state, wood decay and production of lignin-modifying enzymes for

diatrypaceous fungi from Argentina. **International Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v. 1, n. 1, p. 81-96, June 2005.

POINTING, S. B. et al. Screening of basidiomycetes and xylariaceous fungi for lignin peroxidase and laccase gene-specific sequences. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 1, p. 115-124, Jan. 2005.

SANTOS, S. R.; SANSÍGOLO, C. A. Influência da densidade básica da madeira de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na qualidade da polpa branqueada. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 1, p. 53-63, jan./mar. 2007.

SHLEEV, S. V. et al. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. **Biochimie**, Paris, v. 86, n. 9/10, p. 693-703, Sept./Oct. 2004.

SILVA, J. C. **Métodos práticos de tratamento de madeira na propriedade rural**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 40 p.

SMITH, D. M. Maximum moisture content method for determining specific gravity of small wood samples. **Agriculture**, Madison, n. 2014, p. 1-8, 1954.

SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v. 2, n. 1, p. 121-139, jan./abr. 2009.

SUPRAPTI, S. Decay resistance of 84 Indonesian wood species against fungi. **Journal of Tropical Forest Science**, Kuala Lumpur, v. 22, n. 1, p. 81-87, Jan. 2010.

VALDETARO, D. C. O. F. **Morfologia, variabilidade e patogenicidade *Ceratocystis fimbriata* em *Hevea brasiliensis***. 2012. 28 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: _____. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic, 1990. p. 315-322.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FILOGENÉTICA DE BASIDIOMICETOS ASSOCIADOS À PODRIDÃO DA BASE E DO TRONCO DE ÁRVORES VIVAS

RESUMO

Basidiomicetos são amplamente conhecidos por sua importância na ciclagem de nutrientes e decomposição da madeira e, devido a essas qualidades, são muito empregados nas indústrias para diversos fins. Porém para correta utilização desses fungos é necessária uma correta identificação dos mesmos, a fim de facilitar o desenvolvimento de pesquisas voltadas para esses organismos. Para isso, a utilização de ferramentas moleculares se mostra eficiente quando colocadas em contrapartida com características estritamente plásticas desses organismos. No Brasil, estudos sobre espécies de *Ganoderma*, *Perenniporia* e *Rigidoporus* são precários e a maioria se baseia em caracteres morfológicos. Com isso, objetivou-se contribuir com informações morfológicas e moleculares da região ITS de rDNA de espécies desses gêneros coletadas no Brasil – MG. As características morfológicas foram observadas a partir de estruturas do basidioma, quando possível, e colônias crescidas em BDA. A caracterização molecular foi realizada inicialmente por comparação com as sequências de ITS depositadas no GenBank e posteriormente espécies fúngicas que anteriormente já haviam sido estudadas foram inseridas nas árvores filogenéticas. A partir dos caracteres observados foi possível identificar quatro espécies fúngicas *G. subamboinense*, *G. parvulum*, *P. martia* e *R. ulmarius*.

Palavras-chave: Análise filogenética. ITS rDNA. *Ganoderma* spp. *Rigidoporus ulmarius*. *Perenniporia martia*.

**MORPHOLOGICAL AND PHYLOGENETIC CHARACTERIZATION
OF BASIDIOMYCETES ASSOCIATED WITH BASAL STEM AND
TRUNK ROT OF LIVE TREES**

ABSTRACT

Basidiomycetes are widely known for their importance in the cycling of nutrients and wood decomposition and, because of these qualities, are employed in industries for various purposes. However, to properly use these fungi, the correct identification of the same is necessary in order to facilitate the development of researches regarding these organisms. For this reason, the use of molecular tools is shown to be efficient when placed in contrast with strictly plastic characteristics of these organisms. In Brazil, studies on *Ganoderma*, *Perenniporia* and *Rigidoporus* species are poor and the majority is based on morphological characters. Thus, we aimed at contributing with morphological and molecular information of the ITS region of rDNA on four species of this genera collected in MG, Brazil. The morphological characteristics were observed from basidiomata structures, when possible, and colonies grown on PDA. The molecular characterization was initially performed by comparison with the ITS sequences deposited in GenBank and, subsequently, fungal strains that had been previously studied were inserted in the phylogenetic tree. From the characters observed, it was possible to identify four fungal species, *G. subamboinense*, *G. parvulum*, *P. martia* e *R. ulmarius*.

Keywords: Phylogenetic analysis. ITS rDNA. *Ganoderma* spp. *Rigidoporus ulmarius*. *Perenniporia martia*.

1 INTRODUÇÃO

Estudos filogenéticos têm sido empregados na delimitação da taxonomia e nomenclatura de muitos organismos. Nos fungos, as pesquisas se voltam para os que possuem habilidades ímpares atingindo a sociedade de modo problemático, causando doenças ou benefícios ou proporcionando utilização para diversos fins.

Fungos de podridão pertencentes à classe de Basidiomicetos podem ser fitopatogênicos causando doenças em plantas de grande porte, ocasionando conseqüentemente perdas e prejuízos. Os sinais são evidentes com presença de corpos de frutificação nos galhos, raízes ou troncos das árvores. Os sintomas variam de acordo com a espécie patogênica e o hospedeiro. No entanto, os basidiomicetos agem, na maioria das vezes, como saprofiticos, sem causar doença nas plantas.

No Brasil, estudos sobre o gênero *Ganoderma* são insipientes, baseados principalmente na morfologia. Porém, sabe-se que os caracteres morfológicos desse gênero são muito variáveis. Desde o século XX, pesquisas mostram que a morfologia deve ser levada em consideração com muita cautela, como observado por Chen (1993) quando demonstrou que o tamanho dos basidiocarpos pode ser influenciado por fatores ambientais e por Steyaert (1975) ao observar que *G. tornatum* apresentava variação no tamanho dos basidiósporos de acordo com a latitude e altitude.

Fungos do gênero *Ganoderma* já foram relatados causando doenças em mais de 100 hospedeiros, induzindo sintomas de seca dos galhos e morte da planta. Em palmeiras, *G. boninense* causa perdas severas atingindo 50 - 80% das plantações na Malásia e Indonésia, pois degrada o sistema radicular e haste com seca das folhas e tombamento da palmeira (IDRIS et al., 2004).

O mesmo ocorre para as espécies dos gêneros *Perenniporia* e *Rigidoporus* no Brasil. Quanto a esses gêneros, relataram-se duas novas espécies de *Rigidoporus* na Amazônia (GOMES-SILVA; RYVARDEN; GILBERTONI, 2014), registro de *R. crocatus* no Rio Grande do Sul (WESTPHALEN; SILVEIRA, 2012) e presença de *P. tephropora* no sul do Brasil (GERBER; NEVES; LOGUERCIO-LEITE, 1999). Nos trabalhos citados, somente os caracteres morfológicos foram utilizados para descrever as espécies.

Basidiomicetos de *Perenniporia* são constantemente associados a madeiras em decomposição, diferentemente do gênero *Rigidoporus*, para o qual há vários relatos de doenças causadas em árvores de seringueira por *R. microporus*, causando prejuízos nas plantações de *Hevea brasiliensis*, assim como em outros hospedeiros como *Cocos nucifera*, *Anana comosus*, *Delonix regia*, *Tectona grandis*, *Triplochiton scleroxylon* e *Greenwayodendron suaveolens* (NANDRIS; NOCOLE; GEIGER, 1987).

Neste estudo, buscou-se caracterizar os isolados por meio de análises de caracteres morfológicos e de filogenéticas da região de ITS de rDNA dos gêneros *Ganoderma*, *Perenniporia* e *Rigidoporus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e isolamento de fungos

A coleta dos isolados fúngicos foi realizada nas cidades de Lavras e Viçosa em Minas Gerais. Os basidiocarpos associados aos diferentes hospedeiros foram esterilizados superficialmente em álcool 70% e hipoclorito 2%, isolados e armazenados (Tabela 1).

Tabela 1 Fungos basidiomicetos coletados em Lavras e Viçosa – MG no período de 2013 a 2014.

Cód. do isolado	Coordenadas Geográficas (latitude, longitude)		Cidade	Hospedeiro	Gênero/Espécie
PD44	21°13.909'	044°59.860'	Lavras	<i>Delonix regia</i>	<i>Ganoderma</i> sp.
PD45	21°13.899'	044°59.866'	Lavras	<i>Delonix regia</i>	<i>Ganoderma</i> sp.
PD46	21°13.909'	044°59.830'	Lavras	<i>Delonix regia</i>	<i>Ganoderma</i> sp.
PD51	21°13.697'	044°58.865'	Lavras	<i>Astronium fraxinifolium</i>	<i>Ganoderma subamboinense</i>
PD58	21°13.741'	044°57.889'	Lavras	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Ganoderma subamboinense</i>
PD60	21°13.414'	044°99.878'	Lavras	<i>Caesalpinia ferrea</i>	<i>Ganoderma parvulum</i>
PD69	21°13.845'	044°59.410'	Lavras	<i>Delonix regia</i>	<i>Ganoderma parvulum</i>
PD70	20°65.550'	042°87.400'	Lavras	<i>Delonix regia</i>	<i>Ganoderma</i> sp.
PD71	21°13.727'	044°57.917'	Lavras	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Perenniporia martia</i>
PD72	21°13.733'	044°57.911'	Lavras	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Perenniporia martia</i>
PD74	20°65.550'	042°87.400'	Viçosa	<i>Delonix regia</i>	<i>Ganoderma</i> sp.
PD75	20°75.555'	042°87.419'	Viçosa	<i>Delonix regia</i>	<i>Rigidiporus ulmarius</i>
PD76	20°75.450'	042°87.897'	Viçosa	<i>Delonix regia</i>	<i>Rigidiporus ulmarius</i>

PD – refere-se ao código do isolado fúngico.

2.2 Caracterização morfológica

Para a caracterização morfológica, as características dos basidiocarpos foram avaliadas e 20 basidiósporos foram mensurados. Pequenos cortes a partir do basidiocarpo foram feitos para teste em reação de Meltzer.

Colônias crescidas em BDA (Batata-Dextrose-Ágar) foram analisadas durante sete dias e suas características como coloração, forma de crescimento, e crescimento foram anotadas. Para cada colônia foi realizada a avaliação da presença de clamidósporos. Para os isolados que formaram clamidósporos no meio de cultura, realizou-se a mensuração de 20 estruturas com auxílio de microscópio óptico com câmara acoplada.

2.3 Crescimento micelial

Para avaliação do crescimento micelial, discos de 5 mm de diâmetro foram transferidos para placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo BDA. As placas foram incubadas a 15, 20, 25, 30 e 35 °C no escuro. O diâmetro da colônia foi mensurado, diariamente, até completar seis dias, quando o primeiro isolado atingiu a borda da placa.

O Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) foi obtido conforme a equação proposta por Oliveira (1991):

$$IVCM = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

Em que:

D = diâmetro médio atual da colônia

D_a = diâmetro médio da colônia da avaliação anterior

N = número de dias após a inoculação

Para o cálculo estatístico, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para cada temperatura, empregaram-se quatro repetições, e para obtenção das curvas de velocidade de crescimento por temperatura, foram ajustados os modelos de regressão mais apropriados.

2.4 Caracterização molecular

2.4.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA, foram transferidos cinco discos de micélio de 7 mm de diâmetro para frascos contendo 200 mL de meio líquido (20 g de extrato de malte/ 1 L de água) mantido à temperatura de 28 °C por 15 dias. A massa micelial produzida após esse período foi filtrada, seca e mantida a – 80 °C até o momento da extração.

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Patologia Florestal da UFV, utilizando Kit Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega, Madison, EUA) com modificações no protocolo de acordo com Valdetaro (2012).

Inicialmente transferiu-se o micélio para um tubo de *ependorf* de 2 mL, contendo 200 µL de solução de lise dos núcleos e bolinha de chumbo, levado ao aparelho “Tissuelyser III” (Quiagen®) a 30HZ por dois minutos. O macerado obtido foi incubado a -20 °C por cinco min a fim de ajudar na lise celular. Posteriormente, repetiu-se o processo anterior, porém acrescentaram-se 400 µL de solução de lise dos núcleos, macerou-se no “Tissuelyser III” a 30HZ por dois min, e incubou-se a 65 °C por 15 min, invertendo os tubos a cada cinco minutos. Em centrífuga (Eppendorf Microcentrifuge 5415R) as amostras permaneceram por cinco min a 13.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo *ependorf* de 1,5 mL e as amostras foram incubadas à

temperatura ambiente por cinco minutos. Após esse período, adicionou-se 300 μL de solução de precipitação de proteína. Os tubos foram invertidos cuidadosamente e centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL onde foi adicionado 500 μL de Clorofórmio : Álcool Isoamílico (24:1) agitando-se cuidadosamente. As amostras foram centrifugadas a 13.000 durante cinco min e transferidas (fase superior) para um novo tubo de 1,5 mL contendo 600 μL de isopropanol gelado e incubadas “overnight” a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 13.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet* remanescente adicionou-se 600 μL de etanol gelado, agitou-se o tubo cuidadosamente e centrifugou-se a 13.000 rpm por cinco minutos. Essa etapa foi repetida três vezes a fim de se obter DNA livre de impurezas. Após remover o etanol, os tubos foram deixados em posição horizontal com tampa aberta sobre papel toalha por 15 min para secagem do *pellet*. O DNA foi ressuscitado em 30 μL de solução de reidratação de DNA acrescido de 1 μL de solução de RNase e incubado a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min e, posteriormente $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por cinco horas. O DNA obtido de cada isolado foi quantificado e a concentração ajustada para $10\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$ utilizando-se o aparelho Nanodrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.).

2.4.2 Amplificação e purificação dos produtos da PCR

A amplificação e purificação do DNA genômico foram realizadas no Laboratório de Patologia Florestal da UFV de acordo com o protocolo dos *kits* utilizados. Para amplificação, utilizou-se o *kit* Thermo Scientific Dream Taq PCR Master Mix (2X). Os iniciadores utilizados foram os oligonucleotídeos ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990) para estudo da região ITS (Internal Transcribed Spacer). A região foi amplificada usando

termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®), com a seguinte reação 12,5 µL de Dream Taq PCR Master Mix 2x (0,4 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, e 4Mm de MgCl₂), 1,5 µL de cada *primer* diluído (1:10), 2 µL de DNA e 7,5 µL de água ultrapura para completar o volume final da reação de 25 µL.

A reação de PCR foi obtida nas seguintes condições: temperatura de desnaturação de 96 °C por cinco min, seguido de 35 ciclos 94 °C por 30s, 50 °C por 30s, e 72 °C por 90s e extensão final de 72 °C por quatro minutos.

Os produtos resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % a 80 V durante 60 min, contrastados em brometo de etídio 1%. O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado pelo uso do padrão de peso molecular de 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen®). Os géis foram fotografados pelo aparelho de fotodocumentação Loccus Biotecnologia Molecular Imaging Transilluminator. Os produtos da PCR foram purificados usando o Kit GFX PCR DNA® and Gel Band Purification® de acordo com o protocolo do fabricante e armazenados à -20 °C até o momento do sequenciamento.

2.4.3 Edição, alinhamento das sequências e análises filogenéticas

Os fragmentos de DNA foram sequenciados nas direções senso e antissenso no Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa por eletroforese capilar em sequenciador automático MEGA BACE®. A edição dos eletroferogramas gerados foi realizada com o auxílio do programa SeqAssem versão 2007/2008. Sequências obtidas foram comparadas com as sequências de ITS depositadas no GenBank (Tabela 2). O alinhamento das sequências de nucleotídeos foi gerado pela ferramenta ClustalW implementado no programa MEGA versão 6.06, onde foi conduzida a análise e construção de árvores filogenéticas por máxima parcimônia com 1.000 réplicas de *bootstrap*.

A análise filogenética da região ITS do rDNA foi realizada com os isolados PD46, PD51, PD58, PD60, PD69, PD70 e PD74, pertencentes ao gênero de *Ganoderma* e foram comparados com sequências depositadas no GenBank (Tabela 2). A espécie *Amauroderma rude* foi utilizada como *outgroup*. O alinhamento das sequências de ITS foi realizado com 32 sequências e 490 caracteres, com menos de 5% de Gaps resultando no total de 323 caracteres. A árvore filogenética de Máxima Parcimônia (MP) foi obtida por TBR (*Tree-Bisection-Regrafting*) em nível 1, e árvores iniciais obtidas por adição aleatória de sequências com 10 replicatas. A árvore consenso foi inferida a partir de seis árvores mais parcimoniosas (Figura 7).

A análise de *Perenniporia* foi inferida junto às sequências depositadas no GenBank por Robledo et al. (2009) e Zhao e Cui (2012). Como *outgroup* foram utilizados os espécimes *G. applanatum* e *Polyporus arcularius*. A análise da região ITS foi realizada com 32 sequências e 610 caracteres, com menos de 5% de Gaps resultando no total de 482 caracteres. A árvore filogenética de MP foi obtida por TBR (*Tree-Bisection-Regrafting*) em nível 1, e árvores iniciais obtidas por adição aleatória de sequências com 10 replicatas. A árvore consenso foi inferida a partir de três árvores mais parcimoniosas com ramos representando menos de 50% das árvores em colapso (Figura 8).

Para análise filogenética de *Rigidoporus*, foram obtidas sequências da região ITS das espécies *R. pouzarii*, *R. crocatus* e *R. vinctus* (VAMPOLA; VLASÁK, 2012) e representantes de cada clado (Ásia, África e América Central e do Sul) das espécies de *R. microporus* (OGHENEKARO et al., 2014). O fungo *Oxyporus corticola* foi utilizado como *outgroup*. O alinhamento das sequências de ITS foi realizado em 17 sequências e 616 caracteres, com menos de 5% de Gaps resultando no total de 469 caracteres. A árvore filogenética de MP foi obtida por TBR (*Tree-Bisection-Regrafting*) em nível 1, e árvores iniciais obtidas por adição aleatória de sequências com 10 replicatas. A árvore consenso foi

inferida a partir de seis árvores mais parcimoniosas com ramos representando menos de 50% das árvores em colapso (Figura 9).

Tabela 2 Lista de espécimes utilizados nesse estudo, com código, numeração no GenBank, origem, hospedeiro e referências.

Identificação original	Nº. da col.	Nº. GenBank	Origem Geográfica	Hospedeiro	Referência
<i>G. lucidum</i> (Curtis : Fr.) Karst	RSH 0626	Z37048/ Z37072	Taiwan	Serragem	Moncalvo et al., 1995a
<i>G. lucidum</i>	ATCC 32471	X78744/ X78765	Índia	<i>Acrocarpus</i> sp.	Moncalvo et al., 1995a
<i>G. lucidum</i>	RSH RZ	X78743/ X78764	Taiwan	Serragem	Moncalvo et al., 1995a
<i>G. lucidum</i>	JMM P93-J	X78745/ X76766	Filipinas	Árvore caducifólia	Moncalvo et al., 1995a
<i>G. lucidum</i>	RYV 33217	Z37096/ Z37073	Noruega	<i>Betula</i> sp.	Moncalvo et al., 1995a
<i>G. lucidum</i>	CBS 270.81	Z37049/ Z37099	França	nd.	Moncalvo et al., 1995a
<i>G. oerstedii</i> (Fr.) Torr.	ATCC 52409	Z37058/ Z37083	Argentina	nd.	Moncalvo et al., 1995a
<i>G. oerstedii</i>	ATCC 52410	X78739/ X78760	Argentina	<i>Pinus</i> sp.	Moncalvo et al., 1995a
<i>G. multipileum</i> Hou	BCRC 37033	EU021462	Taiwan	nd.	Wang et al. 2009
<i>G. multipileum</i>	CWN 01740	EU021461	Taiwan	nd.	Wang et al. 2009
<i>G. multipileum</i>	ATCC 32472	X87351/ X87361	Índia	nd.	Wang et al. 2009
<i>G. parvulum</i> Murr.	URM 33345	JX310820/ X310834	Brasil	nd.	Lima Jr., 2014
<i>G. parvulum</i>	URM 80765	JX310822/ JX310836	Brasil	nd.	Lima Jr., 2014
<i>G. parvulum</i>	URM 83344	JQ618246/ JX310810	Brasil	nd.	Lima Jr., 2014
<i>G. boninense</i> Pat.	RSH RS	X78749/ X78770	Taiwan	Serragem	Moncalvo et al., 1995a
<i>G. Pfeifferi</i> Bres.	CBS 747-84	X78738/ XT8759	Holanda	<i>Quercus</i> sp.	Moncalvo et al., 1995a
<i>G. subamboinense</i> Henn.	ATCC 52419	X78736/ X78757	Argentina	<i>Platanus acerifolia</i>	Moncalvo et al., 1995b
<i>G. subamboinense</i> var. <i>laevisporum</i> Bazz. e Wright	ATCC 52420	JQ520205	Argentina	<i>Platanus</i> sp.	Moncalvo et al., 1995b

Tabela 2. continua.

<i>G. resinaceum</i> Boud.	CBS 152.27	Z37062/ Z37085	U.K.	nd.	Moncalvo et al., 1995a
<i>G. resinaceum</i>	CBS 194.76	X78737/ X78758	Holanda	<i>Fagus sylvatica</i>	Moncalvo et al., 1995a
<i>G. microsporium</i> Hseu	RSH 0821	X78751/ X78772	Taiwan	<i>Salix babylonica</i>	Moncalvo et al., 1995a
<i>G. weberianum</i> (Bres. e Henn) Stey	CCRC 37081	Z37086/ Z37064	Taiwan	nd.	Smith e Sivasithamparam, 2000
<i>G. weberianum</i>	CBS 219.36	X78734/ X78755	Filipinas	<i>Mangifera</i> sp.	Moncalvo et al., 1995b
<i>P. tephropora</i> (Mont.) Ryvarden	Cui 9029	HQ876601	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. tephropora</i>	Cui 6331	HQ848473	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. corticola</i> (Cormet) Decock	Cui 2655	HQ654093	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. corticola</i>	Dai 7330	HQ654094	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. ochroleuca</i> (Berk.) Ryvarden	MUCL 39726	FJ411098	Taiwan	nd.	Robledo et al., 2009
<i>P. ochroleuca</i>	MUCL 39563	FJ411097	Australia	nd.	Robledo et al., 2009
<i>P. ohiensis</i> (Berk.) Ryvarden	MUCL 41036	FJ411096	USA	nd.	Robledo et al., 2009
<i>P. ohiensis</i>	Cui 5714	HQ654103	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. straminea</i> (Berk.) Ryvarden	Cui 8858	HQ654104	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. straminea</i>	Cui 8718	HQ876600	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. minor</i>	Cui 5782	HQ883475	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. nanligensis</i> (Cui B.K e Zhao C.L.)	Cui 7620	HQ848477	China	Angiosperma	Zhao e Cui, 2012
<i>P. nanligensis</i>	Cui 7541	HQ848479	China	Angiosperma	Zhao e Cui, 2012
<i>P. medula-panis</i> (Jacq.) Donk	MUCL 43250	FJ411087	China	nd.	Zhao e Cui, 2012

Tabela 2. continua.

<i>P. medula-panis</i>	MUCL 47876	FJ411088	Noruega	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. latissima</i> (Bres.) Ryvarden	Cui 6652	HQ876604	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. latissima</i>	Dai 9368	FJ617304	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. martia</i> (Berk.) Ryvarden	MUCL 41677	FJ411092	Argentina	nd.	Robledo et al., 2009
<i>P. martia</i>	MUCL 41678	FJ411093	Argentina	nd.	Robledo et al., 2009
<i>P. fraxinea</i> (Bull.)Ryvarden	Cui 7154	HQ654095	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. fraxinea</i>	Cui 8885	HQ876611	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. robinioiphila</i> (Murrill) Ryvarden	Cui 5644	HQ876609	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. robinioiphila</i>	Cui 7144	HQ876608	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. rhizomorpha</i> Cui B.K. et al.	Dai 7248	JF706330	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. rhizomorpha</i>	Cui 7507	HQ654107	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. subacida</i> (Peck) Donk	Cui 3643	FJ613655	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>P. subacida</i>	Dai 8224	HQ876605	China	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>R. ulmarius</i>	KM 57250	AY593868	UK	nd.	Oghenekaro et al., 2013
<i>R. ulmarius</i>	N 407	KJ559445	Camarões	<i>Gilbertiodendron deweyrei</i>	Oghenekaro et al., 2013
<i>R. ulmarius</i>	KM 178999	KJ559446	UK	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Oghenekaro et al., 2013
<i>R. microporus</i>	MUCL 45064	KJ559482	Cuba	nd.	Oghenekaro et al., 2013
<i>R. microporus</i>	ED 330	KJ559460	Nigeria	<i>Delonix regia</i>	Oghenekaro et al., 2013
<i>R. microporus</i>	X1865	KJ559473	Indonésia	<i>Cocos nucifera</i>	Oghenekaro et al., 2013
<i>R. microporus</i>	FRIM 646	HQ400709	Malásia	<i>Azadirachya excelsa</i>	Oghenekaro et al., 2013

Tabela 2. continua.

<i>R. microporus</i>	X1864	KJ559472	Indonésia	<i>Acacia</i> sp.	Oghenekaro et al., 2013
<i>R. vincetus</i> (Berk.) Rywarden	JV0610 A31B-1	JQ409460	México	Madeira dura	Vampola e Vlasák, 2012
<i>R. vincetus</i>	JV0610 A31B-2	JQ409461	México	Madeira dura	Vampola e Vlasák, 2012
<i>R. crocatus</i> (Pat.) Rywarden	MJ 1909	JQ409466	República Checa	<i>Albies alba</i>	Vampola e Vlasák, 2012
<i>R. crocatus</i>	MJ 3810	JQ409467	República Checa	<i>Albies alba</i>	Vampola e Vlasák, 2012
<i>R. pouzarii</i> (Vampola P. e Vlasák J.)	CWU 5674	JQ733558	República Checa	<i>Alnus glutinosa</i>	Vampola e Vlasák, 2012
<i>R. pouzarii</i>	MJ 32695	JQ409463	Ucrânia	<i>Alnus glutinosa</i>	Vampola e Vlasák, 2012
<i>Amauroderma rube</i> (Berk.) Torr.	JMM ASP.1	X78753/ X78774	Taiwan	nd.	Moncalvo et al., 1995b
<i>G. appplanatum</i> (Pers.) Pat.	BCRC36235	EU232219	Taiwan	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>Polyporus arcularius</i> (Batsch) Fr.	CuITENN78 83 SB12	AF516524	Costa Rica	nd.	Zhao e Cui, 2012
<i>Oxyporus corticola</i>	JV 1206/11	KC176667	República Checa	<i>Fagus</i> sp.	Vampola e Vlasák, 2012

*nd.: não consta na literatura consultada

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização morfológica dos gêneros *Ganoderma*, *Perenniporia* e *Rigidoporus*

3.1.1 *Ganoderma*

As espécies de *Ganoderma* foram observadas em associação a quatro diferentes hospedeiros: *D. regia*, *A. fraxifolium*, *C. zelanicum* e *C. ferrea*. No período da coleta dos basidiomas, as árvores apresentavam desfolha com morte progressiva dos ponteiros e ramos jovens. Os basidiocarpos foram observados na base do tronco de árvores vivas (Anexo I – Figuras 10, 11, 12 e 13). Várias espécies de *Ganoderma* são fitopatogênicas causando podridão basal, resultando no declínio e morte do indivíduo. No Sri Lanka, espécies de *G. lucidum* foram relatadas em árvores de *D. regia*, *C. fistula* e *C. nodosa* causando doença e posteriormente morte do indivíduo (FERNANDO, 2008). Em palmeiras, *G. zonatum* foi observado causando amarelecimento das folhas e crescimento mais lento, infectando as plantas pela raiz e se estabelecendo nos caules onde crescem os basidiocarpos (ELLIOTT; BROSCAT, 2001). Possivelmente os isolados fúngicos de *Ganoderma* causam declínio nos hospedeiros de onde foram coletados, no entanto, faz-se necessário realizar o teste de patogenicidade, de acordo com os postulados de Koch para confirmação da fitopatogenicidade desses fungos.

Os fungos PD44, PD45 e PD46 (Anexo I - Figura 10) foram isolados a partir de basidiocarpos formados na base de árvores de *D. regia*. Os basidiocarpos apresentaram as mesmas características morfológicas para os três isolados, sendo estipitada a séssil, superfície superior com coloração marrom escuro variando para alaranjado.

Os isolados de *Ganoderma* sp. PD44 e PD45 foram observados com crescimento micelial moderado a rápido, com formação de micélio branco e amarelo claro no centro, e formação de estruturas de resistência no centro da colônia com sete dias e nas bordas com 10 dias. Os clamidósporos foram terminais ou intercalados, de parede dupla, hialinos quando retirados das bordas e amarelados se retirados do centro das colônias (Tabela 3).

Os isolados de *Ganoderma* sp. PD70 e PD74 (Anexo I - Figura 11) foram coletados em *D. regia* na cidade de Viçosa - MG e somente diferiram na coloração, variando de marrom escuro para amarelo-dourado. Os basidiocarpos desses isolados apresentaram aspecto geral séssil, coloração não homogênea e himenóforo poroide.

Colônias dos isolados PD70, PD74 e PD46 foram observadas com crescimento lento, micélio branco nas bordas e amarelo no centro, com formação de clamidósporos apenas nas colônias de PD70, aos sete dias no centro, e nas bordas aos 10 dias, são hialinos e com paredes grossas (Tabela 3).

Para os isolados de *G. subamboinense* (PD51 e PD58), as características morfológicas foram: basidiocarpo pequeno, coloração da superfície superior em tons variando entre marrom e vermelho escuro, tornando-se laranja a creme nas margens, sem poros e sulcado, e superfície inferior creme (Anexo I - Figura 12). Resultados foram condizentes aos observados por Bazzalo e Wright (1982).

Os isolados de *G. subamboinense* foram observados com crescimento rápido e formação de manta micelial branca cobrindo toda placa de Petri após sete dias, período em que foi observada à presença, no centro e nas bordas, das colônias de clamidósporos, esféricos e elipsoides com parede dupla (Tabela 3). Características também observadas por Bazzalo e Wright (1982) ao relatar crescimento de 3 - 4,5 cm por dia e micélio branco farináceo na primeira semana e tom amarelado a ocráceo na terceira semana, coloração também observada nos

isolados desse estudo. Ainda os mesmos autores, observaram clamidósporos terminais ou intercalados, dextrinoides com 11-18 x 9-15 μm .

Os isolados de *G. parvulum* (PD60 e PD69) foram coletados a partir de basidiocarpos (ANEXO I - Figura 13) com aspecto séssil, imbricado com coloração da superfície superior vermelho escuro tornando-se marrom alaranjado e margens brancas, lobuladas e lisas. Hifas amiloides. Poros com 134,73 (99,43) - 72,85 μm de comprimento e 112,70 (83) - 57,6 μm de largura, cinco poros por mm. Características similares foram relatadas por Torres, Guzmán-Dávalos e Gugliotta (2012).

O crescimento das colônias de *G. parvulum* foi detectado como desenvolvimento moderado a rápido, com formação de manta micelial branca, farinácea ao sete dias, mesmo período em que foi observada a presença de clamidósporos no centro das placas, e aos 13 dias nas bordas das colônias, de formato globoso, paredes espessas, com paredes internas muito espessas e amareladas (Tabela 3).

Os basidiósporos de *Ganoderma* (Tabela 3), em geral, foram observados com ornamentação variando de oblongo-elíptico a elipsoide com parede grossa, bitunicada, parede externa hialina e interna grossa e escura, superfície enrugada, com pequenas depressões superficiais (Anexo I – Figuras 10e, 11d, 12d e 13f) Na literatura, os tamanhos de basidiósporos de *G. subamboinense* e *G. parvulum* podem variar de 6-9 x 4-6 μm e 8-9 x 6-6,8 μm , respectivamente. Os isolados desse estudo de *G. parvulum* diferiram no tamanho observado na literatura, e os isolados de *G. subamboinense* não formaram basidiósporos nos corpos de frutificação coletados (BAZZALO; WRIGHT, 1982; TORRES; GUZMÁN-DÁVALOS; GUGLIOTTA, 2012).

As características culturais mais úteis para distinguir isolados de *Ganoderma* são a produção de clamidósporo, taxa de crescimento e termofilia. Entretanto, Moncalvo, Wang e Hseu (1995b) observou que a presença de

clamidósporos não diferencia as espécies e os caracteres desenvolvidos em colônias são pouco polimórficos, mas são úteis para distinguir entre os táxons, contudo táxons distantes podem apresentar características culturais similares. A ampla convergência e paralelismo da morfologia e caracteres culturais dos fungos de *Ganoderma* podem ter ocorrido durante a evolução, decorrida em pouco tempo.

3.1.2 *Perenniporia*

Os isolados PD71 e PD72 foram coletados a partir de basidiocarpos que tinham aspecto sésil, pileado, solitário, semicircular de consistência dura, com hifas dextrinoides. Píleo com superfície superior de coloração preta e margens obtusas, usualmente creme a branco, e superfície inferior marrom claro a creme. Poros com comprimento de 121,05 (73,55) - 47,66 μm e largura de 78,19 (48,2) - 33,52 μm , com quatro poros por mm. Características observadas estão de acordo com o relato de Ryvarden (1972).

Basidiósporos de *P. martia* (Tabela 3) foram hialinos com tamanho variável, truncado e parede espessa assim como os encontrados por Ryvarden (1972) ao observar esporos sexuais abundantes em todas as coleções estudadas, porém com tamanho variável, 5-9 x 3-6 μm .

Ao fim de sete dias, os isolados fúngicos de *P. martia* formaram colônias com crescimento moderado e micélio branco. A presença de clamidósporos não foi observada na descrição feita por Ryvarden (1972).

3.1.3 *Rigidoporus*

Basidiocarpos dos isolados PD75 e PD76 foram observados com textura corticosa, aspecto variando entre sésil, efuso-reflexo a ressupinado. Superfície

do píleo glabra a rugosa de cor branca a creme e himenóforo de cor amarelo a creme. Margem definida, inteira, lisa, levemente recurvada para baixo com mesma coloração da superfície porosa. Poros redondos com 209,9 (145,5) - 125,5 μm de comprimento e 214,8 (166,96) - 132,8 μm de largura, com aproximadamente cinco poros por mm. Hifas hialinas a amarelas, dextrinoides. Características similares foram relatadas por Ryvarden e Gilbertson (1994).

Rigidoporus ulmarius formou basidiósporos hialinos, com paredes ligeiramente espessas e formato subgloboso a globoso (Tabela 3). Os basidiósporos são negativos em Melzer (RYVARDEN; GILBERTSON, 1994) e podem ser hialinos a amarelo-claros, apresentando diâmetro de 6 - 7,5 μm (RYVARDEN, 1972), 5 - 7 μm (BUDINGTON; GILBERTSON, 1973) e 6 - 8 x 5 - 6,5 μm (RYVARDEN; GILBERTSON, 1994).

Em meio de cultura, *Rigidoporus ulmarius* formou micélio branco com crescimento médio ao final de sete dias, período que também se observou a formação de clamidósporos, de formato globoso a subgloboso e hialino no centro da placa, e após 10 dias presentes nas bordas (Tabela 3). Observou-se também vesículas com comprimento de 21,19 (13.40) - 10 μm e largura 14,11 (11.63) - 9.63 μm de formato variando de globoso, subgloboso a piriforme.

Características culturais parecidas foram relatadas por Lombard, Davidson e Lowe (1960) para *Fomes ulmarius*, sinônimo do fungo estudado, o qual apresenta crescimento ótimo a 28 °C formando uma manta micelial branca com 22-55 mm de diâmetro após sete dias e clamidósporos hialinos em culturas velhas de formato globoso a ovoide com 4,5 - 7 e 4,5 - 5,5 μm em meio ágar malte. Neste trabalho, os autores também verificaram possível erro de outro estudo, ao relatarem clamidósporos de parede grossa e formato oval com 10 μm de diâmetro, quando na verdade se tratavam de vesículas, diferentes dos clamidósporos por apresentarem paredes finas e corpos esféricos.

Tabela 3. Caracterização micromorfológica dos fungos basidiomicetos *Ganoderma* spp. *Rigidoporus ulmarius* e *Perenniporia martia* coletados em Lavras e Viçosa – MG.

	Basidiósporo (µm)		Clamidósporo (µm)	
	COMPR.	LARG.	COMPR.	LARG.
PD44	12.89(11.15)-10.03	9.33(8.52)-7.13	18.74(13.69)-9.40	15.84(11.32)-8.0
PD45	*		16.65(11.29)-7.35	12.24(8.77)-6.17
PD46	*		*	
PD51	*		15.9(10.12)-5.8	15.8(8.23)-4.3
PD58	*		17.08(11.84)-7.73	11.88(10.15)-7.46
PD60	11.12(10.37)-9.46	6.94(6.69)-5.98	17.8(12.9)-8.4	12.0(9.8)-7.0
PD69	13.16(11.04)-8.63	9.45(7.96)-6.09	32.79(24.2)-17.73	27.43(20.2)-14.02
PD70	11.8(10.75)-10.03	9.10(7.51)-6.74	11.78(10.8)-9.71	9.15(8.59)-8.1
PD71	8.54(7.73)-7.03	5.64(4.60)-3.76	11.66(9.13)-7.23	8.42(7.32)-6.01
PD72	9.47(7.89)-7.04	5.11(4.58)-3.35	9.51(8.16)-7.27	7.68(6.80)-6.03
PD74	*		*	
PD75	7.9(5.81)-4.4	6.8(4.96)-3.3	9.0(8.40)-7.66	8.33(8.1)-7.6
PD76	7.9(5.81)-4.4	6.8(4.96)-3.3	21.19(13.40)-10	14.11(11.63)-9.63

PD: código dos isolados fúngicos; * não foi observado;

3. 2 Crescimento micelial

As curvas de temperaturas foram ajustadas de acordo com as disposições dos isolados nas árvores filogenéticas, exceto para os isolados PD44 e PD45 (Figura 1). As avaliações foram realizadas até os seis dias quando as colônias de PD60 atingiram a borda das placas (Anexo I – Figuras 14 e 15).

Houve interação significativa entre os isolados e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). A temperatura ótima para o maior IVCM dos diferentes isolados variou entre 25 °C e 30 °C.

3.2.1 *Ganoderma*

Os isolados PD44 e PD45 comportaram-se de modo similar nas curvas de temperatura, com maior velocidade de crescimento de \cong 8% (Figura 1).

Observou-se maior diâmetro de 80 mm e 77,5 mm (PD44), e 63 mm e 67 mm (PD45) nas temperaturas de 30 °C a 35 °C.

Os isolados de *Ganoderma* PD46, PD70 e PD74, diferiram entre si nas curvas de temperatura, com IVCM a 30 °C em torno de 7% para os isolados de PD46 e \cong 2% para PD70 e PD74 (Figura 2). As colônias atingiram maior diâmetro de 64 mm a 30 °C (PD46), 23 mm a 25 °C e 30 °C (PD70) e 30 mm a 25 °C (PD74). As diferenças observadas possivelmente estão atribuídas ao local de coleta dos basidiocarpos.

Os isolados de *G. subamboinense* (PD51 e PD58) foram observados com maior velocidade de crescimento, com IVCM em torno de 11% a 30 °C, e maior crescimento micelial em diâmetro de 88 mm e 90 mm (PD51), e 80 mm e 84 mm (PD58) a 25 °C e 30 °C, respectivamente (Figura 3).

Isolados de *G. parvulum* (PD60 e PD69) diferiram nas curvas de IVCM, com velocidades de 13% e 9% (PD60) e 7% e 8 % (PD69) nas temperaturas de 30 °C e 35 °C (Figura 4). O crescimento micelial com maior diâmetro das colônias foi de 90 mm a 30 °C (PD60) e 77 mm (PD69) a 35 °C, diferença ocorrida possivelmente devido à coleta de basidiocarpos a partir de diferentes hospedeiros.

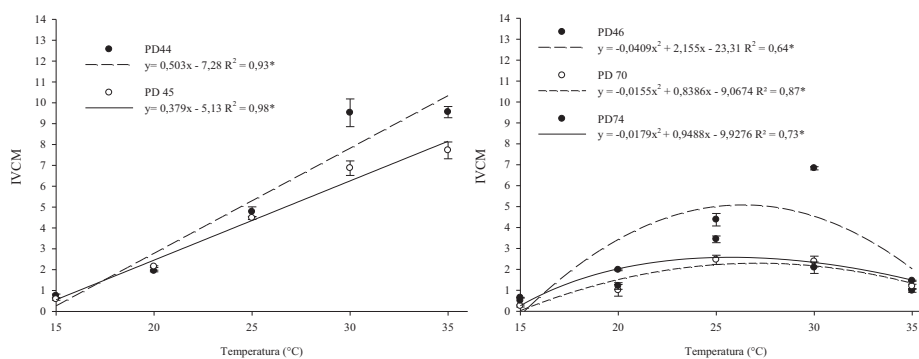


Figura 1 Índice de velocidade de crescimento micelial (%) ao longo de 6 dias em diferentes temperaturas dos isolados de *Ganoderma* sp. (PD44 e 45 à esquerda) e (à direita PD46, PD70 e PD74) isolados de *Delonix regia* em Lavras e Viçosa – MG.

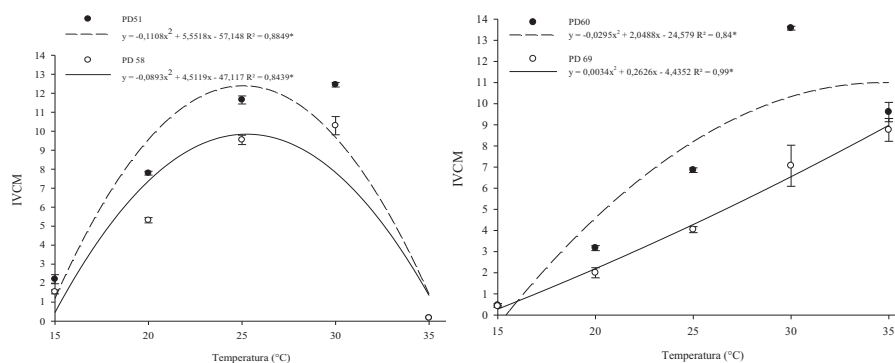


Figura 2 Índice de velocidade de crescimento micelial (%) ao longo de 6 dias em diferentes temperaturas dos isolados de *Ganoderma subamboinense* (PD51 e PD58 a esquerda) isolados de *Astronium fraxifolium* e *Cinnamon zelanicum* e *Ganoderma parvulum* (PD60 e PD69) isolados de *Caesalpinia ferrea* e *Delonis regia* em Lavras - MG.

3.2.2 *Perenniporia*

As espécies de *P. martia* diferiram parcialmente na velocidade de crescimento, com maior IVCM de 3% a 25 °C (PD71) e \cong 5% a 30 °C (PD72) (Figura 5). O crescimento em diâmetro não diferiu estatisticamente nas temperaturas 25 e 30 °C, com 39 mm e 43 mm para PD71, e diferiu para PD72, com maior formação de micélio em diâmetro de 30 mm a 25 °C e 22 mm a 30 °C.

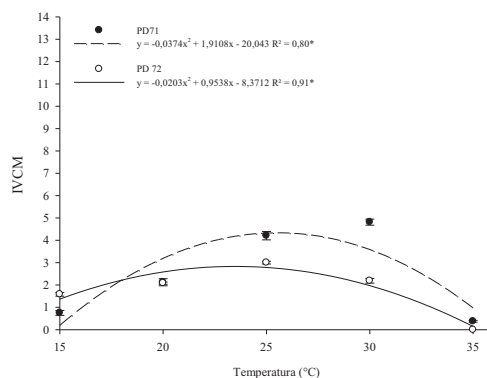


Figura 3 Índice de velocidade de crescimento micelial (%) ao longo de 6 dias em diferentes temperaturas dos isolados de *Perenniporia martia* (PD71 e PD71) isolados de *Cinnamon zelanicum* em Lavras - MG.

3.2.3 *Rigidoporus*

As espécies de *R. ulmarius* apresentaram velocidade de crescimento similar com $\cong 4\%$ de IVCM a 30 °C (Figura 6). Não houve diferença estatística nas temperaturas entre 20 - 30 °C quanto ao isolado PD75, com maior crescimento a 30 °C atingindo 30 mm. O isolado PD76 apresentou crescimento com diferença estatística nas demais temperaturas, com maior diâmetro de 43 mm a 30 °C.

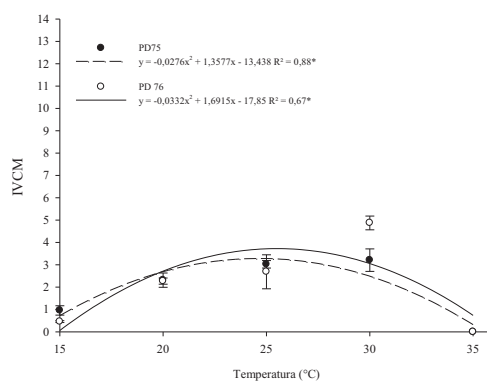


Figura 6 Índice de velocidade de crescimento micelial (%) ao longo de 6 dias em diferentes temperaturas dos isolados de *Rigidoporus ulmarius* (PD75 e PD76) isolados de *Delonix regia* em Viçosa - MG.

3.3 Análise filogenética

3.3.1 *Ganoderma*

As sequências dos isolados PD45 e PD46 foram retiradas da análise devido à sobreposição aparente de duas sequências dentro de cada isolado. Wang e Yao (2005) demonstraram heterogeneidade na região ITS de estirpes de *Ganoderma* e encontraram de dois a seis haplótipos de ITS em um único isolado. Provavelmente, nesse estudo, ocorreu heterogeneidade na região para os isolados PD44 e PD45. Para comprovação dessa hipótese, o produto de amplificação da região ITS deverá ser clonado e sequenciado novamente para posterior estudo.

A análise da região ITS mostrou que os isolados de *G. subamboinense* (PD51 e PD58) estão inseridos no complexo *G. resinaceum* e os isolados *G. parvulum* (PD60 e PD69) e *Ganoderma* sp. (PD46, PD70 e PD74) encontram-se no mesmo clado, próximos às espécies *G. multipileum*. Ambos os clados apresentam forte suporte estatístico.

O clado onde estão inseridas as espécies de *G. subamboinense*, pertence ao grupo monofilético complexo *G. resinaceum* formado por *G. resinaceum*, *G. pfeifferi*, *G. boninense*, *G. microsporum*, *G. subamboinense* var *laevisporum* e *G. weberianum* (MONCALVO; WANG; HSEU, 1995a). As espécies *G. microsporum* e *G. weberianum* apesar de serem alopátricas são coespecíficas (SMITH; SIVASITHAMPARAM, 2000), assim como *G. pfeifferi* (CBS747.84) e *G. resinaceum* (CBS 152.27) (MONCALVO; WANG; HSEU, 1995b).

Ganoderma subamboinense var *laevisporum* e *G. subamboinense* estão no mesmo grupo e clado, tanto nessa análise, como observadas por Hong e Jung (2004) e Wang, Wu e Yao (2014) em análise da região mitocondrial SSU do rDNA. Além disso, diferem em poucas características morfológicas, logo a

variedade “*laevisporum*” possivelmente trata-se de um sinônimo de *G. subamboinense*.

As espécies de *G. subamboinense* ficaram próximas a outras espécies, porém as características morfológicas são bem distintas dos fungos estudados. *G. boninense* possui basidioma maior ($\cong 15$ cm), coloração diferente, marrom-escuro a vermelho na superfície superior, margens brancas e na inferior branco a marrom claro, presença de poros variando de 5 - 6 por mm, sistema hifal anfimítico e basidiósporos maiores 10 - 12 x 7 - 8 μm . Já foi relatado em associação com a podridão do caule e da raiz de palmeiras (RYVARDEN, 2004). *Ganoderma resinaceum* apresenta basidiomas menores ($\cong 5$ cm), consistência moderadamente mole, características similares à *G. subamboinense*, porém diferem na superfície superior que é violeta-marrom a vermelho-escuro, homogênea, com presença 4 - 5 poros por mm e basidiósporos maiores 11 - 12 x 6,5 - 7 μm . *G. weberianum* possui basidioma pequeno ($\cong 5$ cm), ocasionalmente imbricado, coloração vermelho-preto a violeta-marrom, poros 4 - 5 por mm, fibroso, não homogêneo, sistema de hifas dimítico e basidiósporos 8 - 9 x 6 μm (TORRES-TORRES; GUZMÁN-DÁVALOS; GUGLIOTTA, 2012).

Próximo às espécies de *G. multipileum* agruparam os isolados PD60 e PD69 junto às espécies de *G. parvulum*, sinônimo de *G. stipitatum* (RYVARDEN, 2004). Os isolados deste estudo também foram semelhantes aos basidiósporos de *G. parvulum* (8 - 10 e 5 - 6 μm) coletados no Brasil (LIMA JÚNIOR; GIBERTONI; MALOSSO, 2014).

As espécies de *G. parvulum* e *G. multipileum* provavelmente são distintas. Ambas apresentam basidiomas imbricados e raramente sésseis, porém diferem em outras características. *G. multipileum* possui contexto amarelo a marrom-escuro, coreáceo, dextrinoides, presença de poros em maior quantidade 6 - 8 por mm com diâmetro de 60 - 220 μm e basidiósporos levemente maiores 8 - 13,5 e 5,5 - 7,5 μm (WANG et al., 2009).

Os isolados PD70, PD74 e PD46 possuem características morfológicas pouco distintas entre si e foram identificados como *G. aff. oerstedii* (URM 83400) como grupo monofilético e alto valor de *bootstrap*. Anteriormente, *G. aff. oerstedii* foi classificada como *G. resinaceum* e posteriormente renomeada por Lima Júnior, Gibertoni e Malosso (2014) como próxima à *G. oerstedii*. O autor relata ainda, que a espécie *G. aff. oerstedii* está inserida no complexo *G. resinaceum*. No entanto, tais observações não foram evidenciadas na análise filogenética de seu trabalho, e mais estudos devem ser feitos para esclarecer a espécie.

A árvore filogenética da região ITS do rDNA mostra relação de proximidade dos isolados com *G. multipileum* e *G. parvulum*, no entanto estão distantemente relacionados das espécies *G. oerstedii*. Além disso, os isolados fúngicos não estão inseridos no complexo *G. resinaceum* que se encontra separado dos demais fungos (Figura 7).

Na análise filogenética do complexo *G. lucidum* Moncalvo, Wang e Hseu (1995a), observou-se que as espécies *G. oerstedii* da Argentina e *G. lucidum* da Europa (RYV 33217 e CBS 270.81) encontram-se no mesmo clado (I), porém ambas possuem morfologia claramente distintas e por isso foram mantidas em táxon distintos. Espécies de *G. lucidum* oriundas da Ásia (RSH RZ, JMM P93.1, ATCC 32471 e RSH 0626) situadas no clado (II) foram consideradas como espécies de *Ganoderma* que receberam denominações incorretas, separação similar também observada por Smith e Sivasithamparam (2000). Em 2009 as espécies de *G. lucidum* da Ásia foram reconhecidas como *G. multipileum* e as espécies procedentes da Europa mantiveram o mesmo nome (WANG et al., 2009).

O sequenciamento de outras regiões moleculares com regiões genômicas mais variáveis é necessário para inferir a filogenia desse grupo, que provavelmente representa nova espécie.

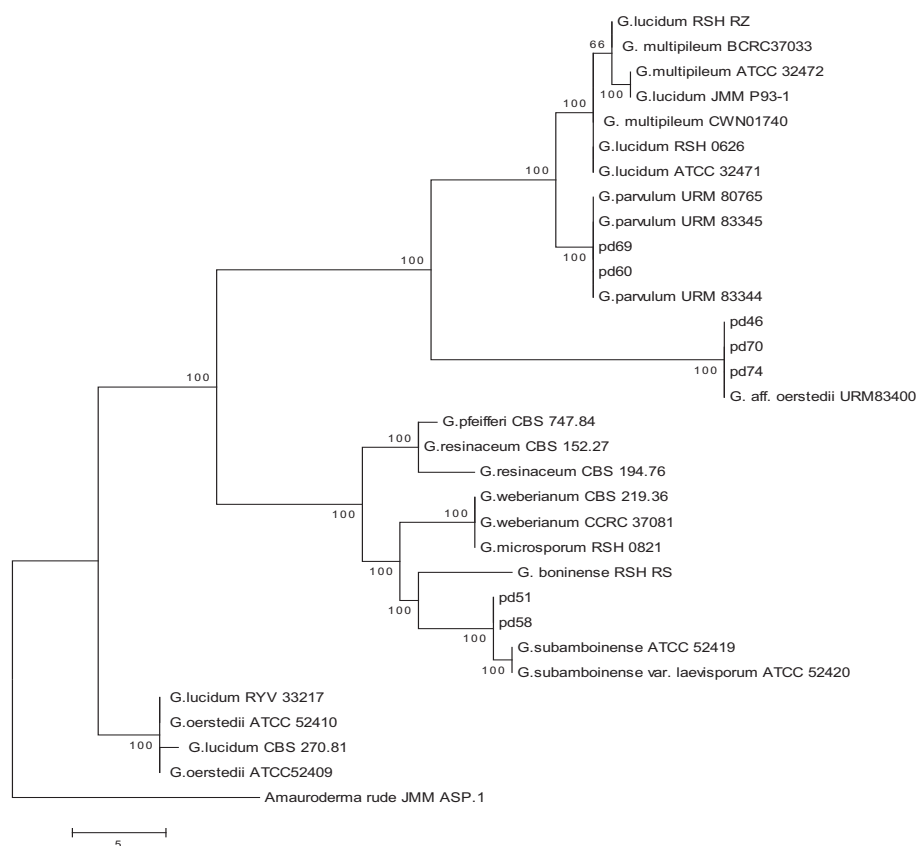


Figura 7 Árvore filogenética de Máxima Parcimônia para a região ITS do rDNA, de espécies de *Ganoderma* spp. e isolados de *Ganoderma* desse estudo. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de bootstrap (1000 repetições) são indicados em porcentagens acima dos internódios. O índice de consistência, retenção e homoplasia foram respectivamente 0,80, 0,96 e 0,78 de todos os sítios, e valor do sítio parcimonioso mais informativo foi de 0,76. A espécie *Amauroderma rude* foi utilizada como outgroup.

3.3.2 *Perenniporia*

Os isolados PD71 e PD72, identificados, molecularmente, como *P. martia* foram similares quanto às características morfológicas, diferindo entre

si, em poucas características culturais como crescimento em diferentes temperaturas e período de formação dos clamidósporos.

O gênero *Perenniporia* está inserido no clado *Perenniporia s.s.*, onde se encontra a espécie tipo do gênero *P. medula-panis* no clado I. As espécies de *P. martia* e *P. latissima* estão inseridas dentro do complexo *P. martia* e foram estabelecidas como sinônimo de *Hornodermoporus* no clado VII, como grupo monofilético, dentro de *Perennipora s.l.* (ZHAO; CUI; DAI, 2013). A definição do clado dentro de outro gênero foi realizada por caracteres morfológicos definidos por Teixeira (1993), onde *Hornodermoporus* é reconhecido por apresentar basidiocarpo pileado, não ramificado e hifas finas fortemente dextrinoides, basidiósporos oblongo-elipsoide, truncado e fortemente dextrinoide, e presença de cistidia.

As espécies *P. martia* e *P. latissima* são estreitamente relacionadas, com características morfológicas similares. Anteriormente, ambas as espécies foram definidas como coespecíficas (RYVARDEN, 1972). Na chave estabelecida por Zhao, Cui e Dai (2013) as únicas distinções nos caracteres morfológicos foram o sistema de hifas e o crescimento do basidiocarpo. Porém com auxílio da análise molecular, as espécies ficaram claramente separadas dentro do clado.

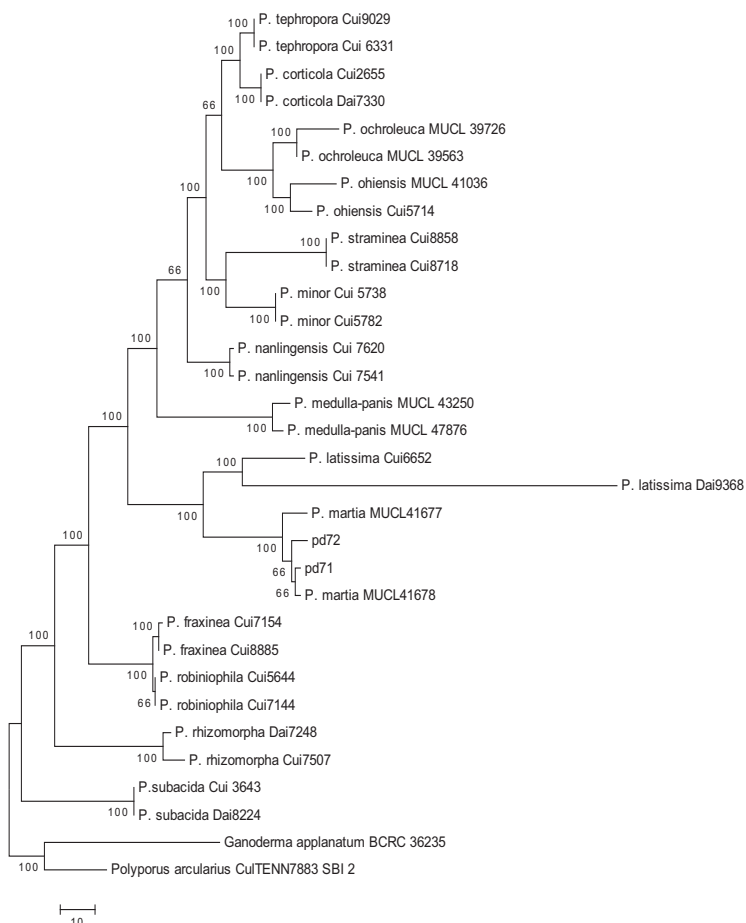


Figura 8 Árvore filogenética de Máxima Parcimônia para a região ITS do rDNA, de espécies de *Perenniporia* ss. e *Perenniporia* sl. e isolados de *Perenniporia* desse estudo. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de bootstrap (1.000 repetições) são indicados em porcentagens acima dos internódios. O índice de consistência, retenção e homoplasia foram respectivamente 0,56, 0,76 e 0,49 de todos os sítios e o valor do sítio parcimonioso mais informativo foi 0,43. As espécies *Polyporus arcularius* e *Ganoderma applanatum* foram utilizadas como outgroup.

3.3.3 *Rigidoporus*

Os isolados de *Rigidoporus* foram identificados como *R. ulmarius*, os quais mostraram-se similares tanto nas características moleculares quanto nas morfológicas. A análise filogenética mostrou que *R. ulmarius* está correlacionado com *R. microporus*, porém é possível observar pela região ITS que ambas as espécies estão separadas dentro do clado, assim como observado por Kaewchai et al. (2010) e Oghenekaro et al. (2014) ao analisarem a filogenia molecular de *R. microporus* das regiões ITS, LSU, β -tubulina e *tef1*.

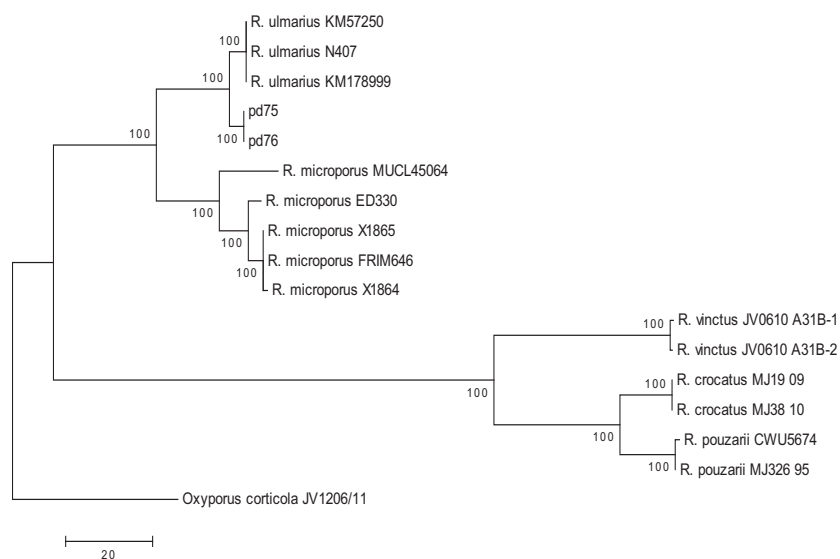


Figura 9 Árvore filogenética de Máxima Parcimônia para a região ITS do rDNA, de espécies de *Rigidoporus* spp. e isolados de *Rigidoporus* desse estudo. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de bootstrap (1.000 repetições) são indicados em porcentagens acima dos internódios. O índice de consistência, retenção e homoplasia foram respectivamente 0,86, 0,95 e 0,82 de todos os sítios, e o valor do sítio parcimonioso mais informativo foi de 0,81. A espécie *Oxyporus corticola* foi utilizada como *outgroup*.

5 CONCLUSÕES

A partir da análise dos caracteres morfológicos e moleculares da região ITS rDNA os isolados PD51, PD58, PD60 e PD69 foram identificados como *G. subamboinense* e *G. parvulum*, assim como os isolados de *Perenniporia martia* (PD70 e PD71) e *Rigidoporus ulmarius* (PD75 e PD76).

Os isolados PD46, PD70 e PD74 foram identificados como *G. aff. oerstedii*, no entanto, mais estudos com diferentes regiões genômicas são necessários para esclarecer a espécie.

REFERÊNCIAS

- BAZZALO, M. E.; WRIGHT, J. E. Survey of the Argentine species of the *Ganoderma lucidum* complex. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 16, p. 293-325, 1982.
- BUDINGTON, A. B.; GILBERTSON, R. L. Some Southwestern lignicolous Hymenomycetes of special interest. **Southwestern Naturalist**, Weslaco, v. 17, p. 409-422, 1973.
- CHEN, C. S. Methods for inducing various morphological fruiting body of *Ganoderma tsugae* Murr. **Trans. Mycol. Soc. Republ**, v. 8, p. 9-16, 1993.
- ELLIOTT, M. L.; BROSCHEAT, T. K. Observations and pathogenicity experiments on *Ganoderma zonatum* in Florida. **Palms**, Lawrence, v. 45, n. 2, p. 62-72, 2001.
- FERNANDO, K. M. E. P. The host preference of a *Ganoderma lucidum* strain for three tree species of Fabaceae family; *Cassia nodosa*, *Cassia fistula* and *Delonix regia*. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, Sri Lanka, v. 36, n. 4, p. 323-326, July 2008.
- GERBER, A. L.; NEVES, M. A.; LOGUERCIO-LEITE, C. Some species of *Perenniporia* Murrill (Poriales, Basidiomycotina) from Southern Brazil. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 185-193, fev. 1999.
- GOMES-SILVA, A. C.; RYVARDEN, L.; GILBERTONI, T. B. New records of Ganodermataceae (Basidiomycota) from Brazil. **Nova Hedwigia**, Berlin, v. 92, n. 1/2, p. 83-94, Feb. 2014.
- HONG, S.; JUNG, H. Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences. **Mycologia**, New York, v. 96, n. 4, p. 742-755, Mar. 2004.
- IDRIS, A. S. et al. Selection for partial resistance in oil palm progenies to *Ganoderma* basal stem rot. **Journal of Oil Palm Research**, Benin City, v. 16, n. 2, p. 12-18, Dec. 2004.
- KAEWCHAI, S. et al. Characterization of *Rigidoporus microporus* isolated from rubber trees based on morphology and ITS sequencing. **Journal of Agricultural Technology**, Tokyo, v. 6, n. 2, p. 289-298, 2010.

LIMA JÚNIOR, N. C.; GIBERTONI, T. B.; MALOSSO, E. Delimitation of some neotropical laccate *Ganoderma* (Ganodermataceae): molecular phylogeny and morphology. **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v. 62, n. 3, p. 1-7, 2014.

LOMBARD, F. F.; DAVIDSON, R. W.; LOWE, J. L. Cultural characteristics of *Fomes ulmarius* and *Poria ambigua*. **Mycologia**, New York, v. 52, p. 280-294, 1960.

MONCALVO, J. M.; WANG, H. H.; HSEU, R. S. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 12, p. 1489-1499, Dec. 1995a.

MONCALVO, J. M.; WANG, H. H.; HSEU, R. S. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the Internal Transcribed Spacers and 25S ribosomal DNA sequences. **Mycologia**, New York, v. 87, n. 2, p. 223-238, Mar./Apr. 1995b.

NANDRIS, D.; NOCOLE, M.; GEIGER, J. P. Root rot disease of rubber tree. **Plant Disease**, Quebec, v. 71, p. 296-306, 1987.

OGHENEKARO, A. O. et al. Molecular phylogeny of *Rigidoporus microporus* isolates associated with white rot disease of rubber trees (*Hevea brasiliensis*). **Fungal Biology**, New York, v. 118, n. 5/6, p. 495-506, Apr. 2014.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.)**. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

ROBLEDO, G. L. et al. *Perenniporiella chaquenya* sp. nov. and further notes on *Perenniporiella* and its relationships with *Perenniporia* (Poriales, Basidiomycota). **Mycologia**, New York, v. 101, n. 5, p. 657-673, Sept./Oct. 2009.

RYVARDEN, L. Neotropical Polypores: part 1. **Synopsis Fungorum**, Devon, v. 19, n. 1, p. 69-103, 2004.

RYVARDEN, L. Studies in the Aphyllophorales of Canary Islands with a note on the genus *Perenniporia*. **Norwegian Journal of Botany**, Oslo, v. 19, p. 139-144, 1972.

RYVARDEN, L.; GILBERTSON, R. L. European polypores: part 2. **Synopsis Fungorum**, Devon, v. 7, n. 1, p. 394-743, 1994.

SMITH, B. J.; SIVASITHAMPARAM, K. Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of five species of *Ganoderma* from Australia. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 8, p. 943-951, Aug. 2000.

STEYAERT, R. L. The concept and circumscription of *Ganoderma tornatum*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 65, p. 451-467, 1975.

TEIXEIRA, A. R. **Chave para identificação dos gêneros de Polyporaceae com base na morfologia do basidiocarpo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1993. 55 p.

TORRES-TORRES, M. G.; GUZMÁN-DÁVALOS, L.; GUGLIOTTA DE, A. M. *Ganoderma* in Brazil: known species and new records. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 121, n. 1, p. 93-132, July/Sept. 2012.

VALDETARO, D. C. O. F. **Morfologia, variabilidade e patogenicidade *Ceratocystis fimbriata* em *Hevea brasiliensis***. 2012. 28 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

VAMPOLA, P.; VLASÁK, J. *Rigidoporus pouzarii*, a new polypore species related to *Rigidoporus crocatus*. **Czech Mycology**, Brno, v. 64, n. 1, p. 3-11, July 2012.

WANG, D. M. et al. *Ganoderma multipileum*, the correct name for "*G. lucidum*" in tropical Asia. **Botanical Studies**, Minneapolis, v. 50, p. 451-458, Apr. 2009.

WANG, D. W.; WU, S. H.; YAO, Y. J. Clarification of the concept of *Ganoderma orbiforme* with high morphological plasticity. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 5, May 2014. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0098733&representation=PDF>>. Acesso em: 10 Aug. 2014.

WANG, D. M.; YAO, Y. J. Intrastrain internal transcribed spacer heterogeneity in *Ganoderma* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, n. 2, p. 113-121, Feb. 2005.

WESTPHALEN, M. C.; SILVEIRA, R. M. B. Interesting resupinate species of *Rigidoporus* from Brazil. **Nova Hedwigia**, Berlin, v. 94, n. 3/4, p. 397-404, Jan. 2012.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: _____. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic, 1990. p. 315-322.

ZHAO, C. L.; CUI, B. K. A new species of *Perenniporia* (Polyporales, Basidiomycota) described from southern China based on morphological and molecular characters. **Mycological Progress**, Berlin, v. 11, n. 2, p. 555-560, May 2012.

ZHAO, C. L.; CUI, B. K.; DAI, Y. C. New species and phylogeny of *Perenniporia* based on morphological and molecular characters. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 58, n. 1, p. 47-60, Jan. 2013.

ANEXO

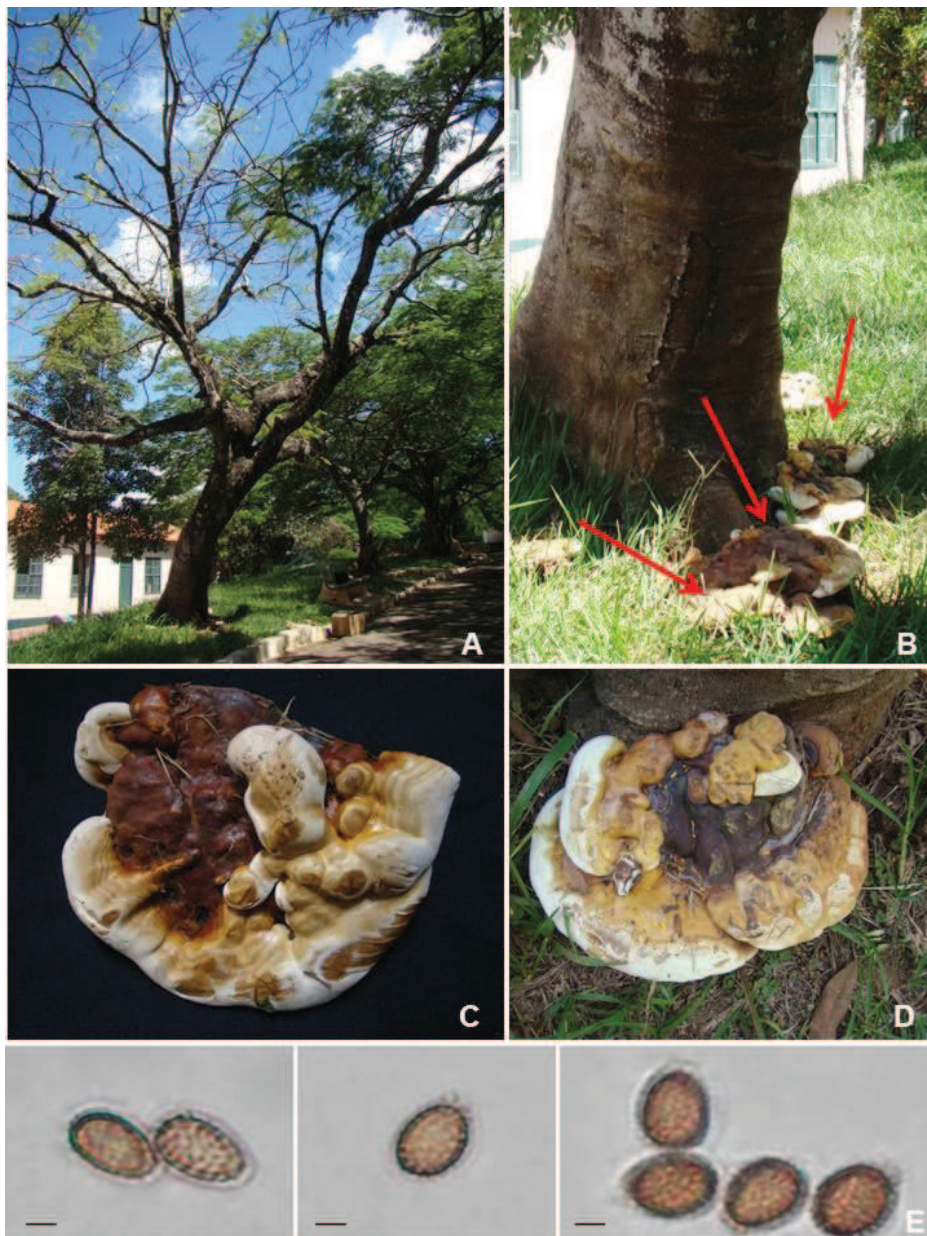


Figura 10 *Ganoderma* sp. associado a podridão de *Delonix regia* em Lavras - MG. A) Die-back da árvore de flamboyant, B), C) e D) Basidiocarpos associados a base e raiz da árvore, E) Basidiósporos (bar. = 2 μ).

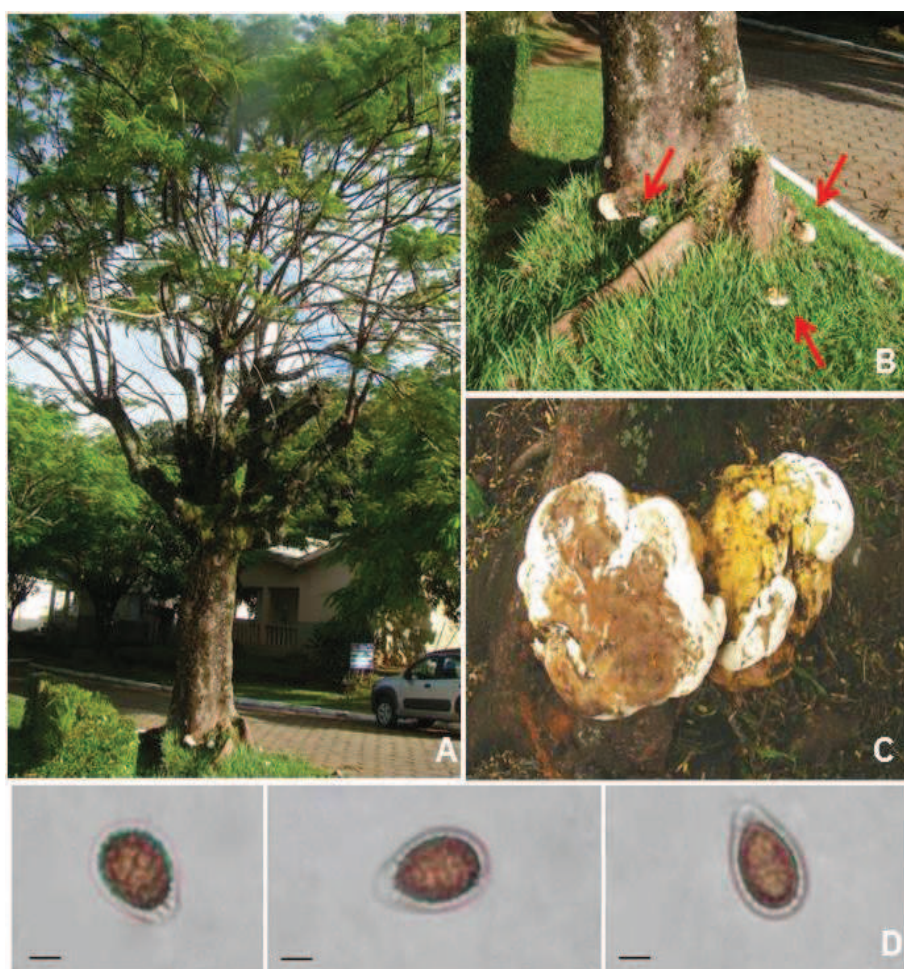


Figura 11 *Ganoderma* sp. associado à *Delonix regia* em Viçosa - MG. A) Árvore de flamboyant. B), C), D) e E) Basidiocarpos associados à base, raiz e toco onde foi feito poda na árvore, D) Basidiósporos (bar. = 2 μ)



Figura 12 *Ganoderma* sp. associado à *Astronium fraxinifolium* e Lavras - MG. A) Dieback da árvore de gonçalo-alves, B1), B2), C1) e C2) Basidiocarpos presentes no caule da árvore, D) Basidiósporos (bar. = 2 μ).



Figura 13 *Ganoderma* sp. associado à *Caesalpinia ferrea* em Lavras - MG. A) Die-back da árvore de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*), B), C), D) e E) Basidiocarpo associado à base do caule da árvore.

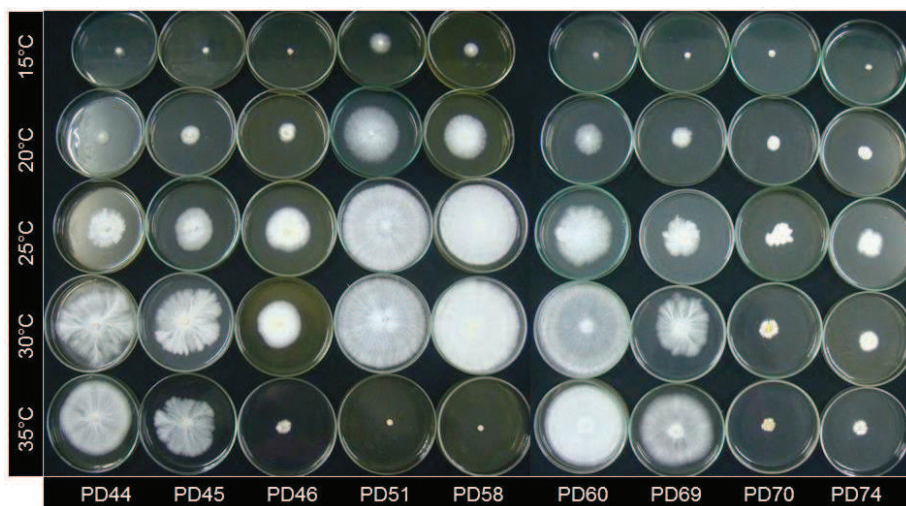


Figura 14 Crescimento de colônias fúngicas de *Ganoderma* spp. em diferentes temperaturas após seis dias.

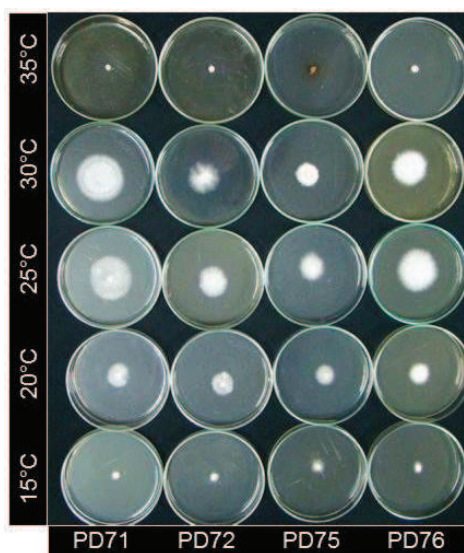


Figura 15 Crescimento de colônias fúngicas de *Perenniporia martia* e *Rigidoporus ulmarius* em diferentes temperaturas após seis dias.