

UNIVERSIDADE FEDERAL DE AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Identificação molecular e relações filogenéticas de espécies da ordem Phallales**

Bolsista: Fracislaide da Silva Costa

Orientador (a): Dra. Doriane Picanço Rodrigues

Co-orientador (a): Msc. Tiara Sousa Cabral

MANAUS  
AMAZONAS – BRASIL  
OUTUBRO/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Identificação molecular e relações filogenéticas de espécies da ordem Phallales**

Bolsista: Fracislaide da Silva Costa

Orientador (a): Dra. Doriane Picanço Rodrigues

Co-orientador (a): Msc. Tiara Sousa Cabral

Relatório Final, referente ao período de agosto/2013 a julho/2014, apresentado à Universidade Federal de Amazonas, como parte das exigências do PIBIC/CNPq.

MANAUS  
AMAZONAS - BRASIL  
OUTUBRO/2014

# **Identificação molecular e relações filogenéticas de espécies da ordem *Phallales***

## **1. Resumo**

Os fungos compõem um vasto grupo de organismos eucariotos heterotróficos morfológicamente muito distintos e apesar dessa diversidade ainda são pouco estudados. A ordem *Phallales* compreende seis famílias com maior abundância na floresta Amazônica. A ordem encontra-se delimitada principalmente com base em caracteres morfológicos, entretanto as relações entre as famílias ainda são muito conflitantes resultando assim em um grande número de sinonímias para a ordem. Diante do exposto conduziu-se este trabalho com objetivo de estudar a diversidade da ordem *Phallales* e auxiliar, dessa forma, a delimitação desses organismos. Foram coletadas oito espécies na Amazônia Central. As análises moleculares foram feitas com base no DNA mitocondrial e nuclear, a partir destas obteve-se uma árvore filogenética em que foram propostas algumas alterações a nível de espécie, gênero e família, entretanto ainda é necessário mais trabalhos envolvendo o grupo, afim de ampliar a amostragem dos taxa subordinados neste, visando, desta forma contribuir para sua melhor delimitação.

**Palavras Chave:** fungos, filogenia, floresta Amazônica.

## **2. Introdução**

Os fungos constituem um vasto grupo de organismos eucariotos heterotróficos com morfologia e dimensões muito distintas, variando desde formas microscópicas até formas macroscópicas. Apresentam um conjunto de características próprias que permitem sua diferenciação das plantas: são aclorofilados, presença de substâncias quitinosas (o mesmo composto encontrado no exoesqueleto de insetos e crustáceos) ao invés de celulose na parede celular da maior parte das espécies e a capacidade de depositar glicogênio, características comuns também em células animais (KENDRICK, 2001). Além destas características também apresentam outras peculiaridades, tais como o modo de nutrição que é absorptivo, em geral utilizando uma grande diversidade de enzimas para quebrar estruturas complexas (que na maioria das vezes não são

degradadas por outros organismos) em substâncias mais simples de fácil absorção (STAMETS, 2005).

No passado os fungos foram tratados como pertencendo ao Reino das Plantas devido à semelhança com os vegetais, como ausência de locomoção e pela semelhança morfológica que os cogumelos compartilham com as plantas. Os fungos só foram tratados independentemente quando Whitaker (1969) propôs o estabelecimento do Reino Fungi, segregando os fungos das plantas. Embora por motivos históricos os Fungos ainda sejam muitas vezes considerados uma subárea da Botânica (Criptógamas), sabe-se com base em evidências morfológicas, bioquímicas e moleculares (estudos genéticos), que os fungos são evolutivamente mais próximos dos animais do que das plantas.

O filo *Basidiomycota* constitui um vasto grupo de fungos, com mais de trinta mil espécies (WEBSTER e WEBER, 2007), que possuem estruturas chamadas basídios onde núcleos diploides produzem esporos (basidiósporos) haploides por meiose (ALEXOPOULOS et al., 1996). Em nível microscópico, os basidiomicetos possuem duas particularidades que caracterizam o filo: uma é a presença de grampos de conexão que aparentemente ligam células adjacentes das hifas, e a outra é em relação aos esporos, que geralmente são do tipo balistosporo (liberação ativa), mas que também podem ser do tipo estatismoporos (liberação passiva) como nos fungos gasteróides (GUGLIOTTA e CAPELARI, 1998; CARLILE et al., 2001).

Os fungos gasteróides (historicamente denominados *Gasteromycetes*), por sua vez, podem ser caracterizados pela maturação dos basidiósporos dentro do basidioma, liberados por estatismosporia (ALEXOPOULOS et al., 1996). Nesses fungos, os basidiósporos maturam dentro de um tecido chamado gleba, que possui cavidades revestidas pelo himênio (ELLIS e ELLIS, 1990).

Alguns gasteróides são conhecidos como “puffballs”, “earthstars”, “stinkhorns” e “bird’s nest fungi”. Apesar da diversidade morfológica, os basidiomas possuem em comum uma parede externa característica, denominada perídio. Esta estrutura pode apresentar uma a várias camadas e abrir de várias maneiras depois que os esporos estão maduros, ou se mantém fechada, com a liberação dos esporos ocorrendo quando esta parede se desintegra (MILLER e MILLER, 1988).

Atualmente, gasteromicetes passou a ser uma terminologia desprovida de significado taxonômico, por se tratar de um grupo polifilético, conforme indicam vários estudos recentes, utilizando não somente dados de morfologia comparada, mas também dados de ontogenia e filogenia molecular (HIBBETT et al., 1997; KRUGER et al., 2001; BINDER e BRESINSKY 2002; HIBBETT, 2007; MATHENY et al. 2006; HOSAKA et al., 2006). Contudo, por questões históricas e didáticas este termo genérico continua sendo utilizado. De acordo com Miller e Miller (1988), o termo gasteromicetes tem sua origem na combinação de duas palavras de origem grega “gaster” (estômago) e “mycetes” (fungo). Assim os consideramos como “fungos-estômago” com base na sua morfologia angiocárpica.

Hoje, não restam dúvidas de que os gasteromicetes evoluíram de maneira independente em diferentes linhagens dentro dos basidiomicetos. Enfatiza-se o fato de que a morfologia convergente não deve, portanto ser considerada como decisiva na sistemática uma vez que a forma dos basidiomas é vista como uma notável homoplasia nos *Homobasidiomycetes* (MONCALVO et al., 2002). Deste modo, os gasteromicetes encontram-se atualmente desmembrados em várias ordens de *Basidiomycota*, como *Agaricales* Clém., *Boletales* E.-J. Gilbert, *Hysterangiales* Hosaka e Castellano, *Geastrales* Hosaka e Castellano, *Russulales* Kreisel ex P.M. Kirk, P.F. Cannon e J.C.David, *Phallales* E. Fisch. (KIRK et al., 2008). Este último clado foi denominado de subclasse *Phallomycetidae* por Hosaka et al. (2006) com uma abordagem molecular, e engloba as ordens *Phallales*, *Geastrales*, *Hysterangiales* e *Gomphales*.

A ordem *Phallales* Fischer compreende os fungos conhecidos como stinkhorns e lattice stinkhorns, por apresentarem gleba mucilaginosa que exala odores atrativos aos agentes dispersores, que na maioria das vezes são insetos (ALEXOPOULOS et al., 1996). Com base em análises de filogenia molecular, Hosaka et al. (2006) consideram seis famílias para a ordem, *Trappeaceae*, *Claustulaceae*, *Clathraceae*, *Protophallaceae*, *Phallaceae* e *Lysuraceae*. Os representantes da ordem apresentam uma enorme diversidade morfológica e se caracterizam pelo perídio com duas a três camadas, inicialmente o perídio envolve completamente o receptáculo e a gleba, na maturidade poderá se romper (na maioria dos representantes) a partir do ápice, o remanescente basal recebe a denominação de receptáculo (CUNNINGHAM, 1942). Podem ser inicialmente hipógeos tornando-se epígeos (desenvolvimento abaixo da terra e acima da terra, respectivamente) com a maturidade, permanecer hipógeos, ou ainda podem ser

totalmente epígeos. As famílias *Trappeaceae*, *Claustulaceae* e *Protophallaceae* são caracterizadas por não possuírem pseudoestipe, e muitos não possuem deiscência, ou seja, o perídio permanece fechado mesmo após a maturação da gleba, o que confere um corpo de frutificação oval a piriforme. O receptáculo pode variar de um pseudoestipe oco com a gleba localizada no ápice (em *Phallaceae* e *Lysuraceae*), a uma estrutura em forma de gaiola (*Clathraceae*) formada por braços que se inter cruzam, onde localiza-se a gleba (CUNNINGHAM, 1942). Em todas as espécies, a gleba é gelatinosa a mucilaginoso, e apresenta odor forte. A gleba é a porção fértil, onde se encontram basídios clavados e basidiósporos em forma de bastonete (MILLER e MILLER, 1988).

Apesar de as relações entre as famílias estarem aparentemente bem estabelecidas, as relações entre os gêneros dentro de cada família ou ainda a delimitação taxonômica entre os taxa, ainda são conflitantes, o que resulta em um grande número de sinonímias para a ordem *Phallales*. Isso em parte se deve à dificuldade em separar morfológicamente os taxa tanto em nível de espécie quanto de gênero, devido à escassez e plasticidade dos caracteres disponíveis para classificação taxonômica (BEGEROW et al., 2010). Aliado a isso, o fato de possuírem frutificação efêmera e a difícil preservação do material também influenciam na taxonomia e sistemática das espécies nessa ordem.

As classificações prévias para esse grupo são horizontais ao invés de verticais, como afirma Dring (1980), ou seja, são classificações que privilegiam as características estruturais, onde espécies são colocadas como proximamente relacionadas devido a determinadas semelhanças morfológicas. À luz de dados moleculares, muitos caracteres morfológicos mostram-se ser homoplásticos ou filogeneticamente não informativos (BEGEROW, 2007), e a evolução morfológica convergente parece ser bem difundida entre fungos (HIBBETT et al, 2007). Assim, a filogenia molecular pode ser utilizada como uma importante ferramenta para auxiliar a sistemática desses fungos, de forma que uma classificação natural mais próxima da realidade possa ser atingida. De fato, os últimos 20 anos foram marcados por avanços em metodologias que fizeram os processos de identificação de espécies e estabelecimento de níveis hierárquicos em fungos serem mais rápidos e confiáveis, através da sistemática taxonômica e filogenética molecular (BEGEROW et al., 2010).

Para fungos onde a taxonomia alfa ainda encontra sérios problemas, como é o caso dos *Phallales*, a utilização de ferramentas moleculares é de extrema importância.

Isso possibilita estudos de revisões taxonômicas, como também a delimitação confiável de espécies proporciona posteriores estudos de ecologia e conservação, assim como a avaliação da biodiversidade (BEGEROW et al, 2010). É preciso lembrar que apesar de dados moleculares estarem mais acessíveis, o Código de Nomenclatura Botânica ainda exige a taxonomia morfológica nas descrições de novas taxa, de modo que se devem aliar os dois tipos complementando-se.

### 3. Justificativa

A falta de estudos e a conseqüente escassez de informações sobre a micobiota em ambientes tropicais subestima a biodiversidade desse Reino considerado como um dos mais diversos, com estimativas de diversidade que supera a dos insetos. Atualmente, conhecemos aproximadamente oitenta mil espécies de fungos, o que não chega a dois por cento das estimativas do total existente. As florestas tropicais, segundo as estimativas recentes, abrigam a maior parte da diversidade ainda desconhecida.

Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que visem o conhecimento dos fungos em ambientes tropicais, em particular em ambientes de domínio de floresta Amazônica, principalmente os *Phallales* que possuem sua maior diversidade nesses ambientes. Ainda, o conhecimento da diversidade por dados moleculares, possibilita a delimitação de táxons incertos, onde a ferramenta molecular torna-se fundamental.

Estudos como o presente proporcionarão iniciativas posteriores que envolvam bioprospecção, uma vez que os fungos sintetizam bioprodutos muito interessantes e com potencial farmacológico. É considerável a quantidade de metabólitos secundários já encontrados em fungos conhecidos, como antibióticos; aliado a isso, a extensa diversidade biológica inexplorada faz dos fungos um dos mais promissores recursos para biotecnologia.

#### **4. Objetivos**

##### *Objetivo Geral*

Integrar espécies amazônicas à filogenia molecular da ordem *Phallales* com sequências diagnósticas padrões e DNA barcodes e com este conjunto de dados, inferir sobre a classificação e evolução de clados deste grupo.

##### *Objetivos específicos:*

- Caracterizar molecularmente (por DNA Barcode) as espécies da ordem *Phallales* coletadas em períodos chuvosos na Amazônia Central.
- Resolver clados da atual filogenia molecular de *Phallales*, integrando as espécies amazônicas com as espécies conhecidas, delimitando assim níveis hierárquicos na classificação da ordem, que atualmente estão incertos.

## 5. Metodologia

### *Coleta, processamento e herborização dos espécimes*

#### *- Período e áreas de coletas*

Espécimes já coletados e depositados no herbário INPA-Fungos foram utilizados para as análises iniciais. Coletas adicionais foram realizadas no período chuvoso onde são encontrados o maior número de frutificações de basidiomicetos devido à dependência da água para liberação de esporos.

As áreas de coleta se concentraram na Amazônia Central, em áreas próximas a Manaus. Com a finalidade de aumentar a representatividade de espécies nas análises, empréstimos de exsicatas foram realizados em diferentes herbários nacionais, verificando a disponibilidade no INCT Herbário Virtual da Flora e dos Fungos (<http://inct.splink.org.br/>) e em herbários não cadastrados neste banco de dados, assim como em herbários internacionais. Todas as coletas realizadas neste projeto foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) através do registro feito por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio), tendo como números de registro: 37506-1, 43426-1 e 38853.

#### *- Estudo e identificação dos espécimes*

O estudo dos espécimes foi realizado no Laboratório de alunos da Botânica – INPA. Para a análise das microestruturas foram utilizados microscópios e lupas, e foi seguida a metodologia tradicional para taxonomia deste grupo, ou seja, para a confecção das lâminas o material foi cortado à mão livre, com auxílio de lâmina de barbear e manipulado com estiletes. Para observação das microestruturas do basidioma foram feitos cortes transversais, à lupa, e com ajuda de dois estiletes as camadas foram separadas e colocadas sobre lâminas distintas, contendo KOH (hidróxido de potássio) a 5 %. Em seguida as hifas foram separadas com o estilete até o conteúdo tornar-se quase homogêneo, sendo finalmente observadas ao microscópio. Para a obtenção das medidas microscópicas foram feitas 25 medidas de cada uma das microestruturas e anotados os valores extremos.

## *Análises Moleculares*

### *- Extração de DNA*

A extração de DNA foi realizada com material herborizado e fresco, seguindo o protocolo de Cabral et al. (2012) que emprega o detergente CTAB 2%. O protocolo consiste em macerar 0,15g do material (qualquer parte do corpo de frutificação) com micropistilos, com 500µl de tampão CTAB 2% (CTAB, NaCl 5M, Tris-HCl 1M, EDTA 500mM, β-mercaptoetanol) previamente aquecido e incubar as amostras em banho-maria durante 30 min à 65°C. Em seguida, é realizada a extração do DNA, adicionando clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e centrifugando a 10000 g por 10 min. Após essa fase, adiciona-se isopropanol 60% para precipitação do DNA, seguido de centrifugação a 11000 g por 20 min, e lavagem final com etanol 70%. O etanol é então descartado, e espera-se o DNA secar. O DNA foi ressuspendido após secagem em 50µl de água DNase Free. Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 nm.

### *- Escolha dos primers para amplificação por PCR*

Para amplificação das regiões para análise de filogenia molecular, foram utilizados os primers: LROR-LR5 (VIGALYS, 1990) para região de DNA ribossômico (nuc-LSU-28S); e ATP6-1 e ATP6-2 (KRETZER e BRUNS, 1999) para região do DNA mitocondrial que codifica a subunidade 6 da ATPase, os mesmos primers foram usados para as reações de sequenciamento. As sequências de cada primer estão na Tabela 01.

Tabela 1 Sequências dos primers utilizados

<b>Primer</b>	<b>Sequência 5'-3'</b>
LROR	ACC CGC TGA ACT TAA GC
LR5	TCC TGA GGG AAA CTT CG
ATP6-1	ATT AAT TSW CCW TTA GAW CAA TT
ATP6-2	TAA TTC TAN WGC ATC TTT AAT RTA

### *- Reações de PCR*

As amplificações das regiões foram realizadas conforme as instruções dos fornecedores das enzimas, considerando as características específicas de temperatura de anelamento dos primers escolhidos. Os programas utilizados para cada primer estão especificados na Tabela 2.

As reações foram realizadas em volume final de 20µl, contendo 2 µl tampão 10x (Buffer A, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> – kapabiosystems), 0,5 µl de dNTPs (10µM/µl), 0,8 µl de primers forward e reverse (10µM/µl), 1 µl da amostra de DNA (25ng/µl), 0,08 µl Taq DNA Polimerase (5 U/µl), completando com água para o volume final.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentados em Easy Doc Transluminador (Bioagency), utilizando-se 3µl do produto de PCR e 1µl de tampão de corrida (Azul de Bromofenol).

Tabela 2 Programas de amplificação para cada região.

<b>Região</b> <b>Ciclo</b>	<b>Desnaturação inicial</b>	<b>Ciclagem</b>	<b>Extensão Final</b>
nuc-LSU	95°C por 5'	30x [1' a 94°C; 30'' a 45°C; 2' a 72°C]	5' a 72°C
ATP6	95°C por 2'	5x [35'' a 94°C; 55'' a 37°C; 1' a 72°C] 30 x [35'' a 94°C; 55'' a 45°C; 1' a 72°C]	5' a 72°C

#### *- Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento*

A adequada purificação de produtos de PCR é essencial para garantir uma boa qualidade da sequência gerada. Para a purificação de produtos de PCR, foram utilizadas as enzimas ExoSAP-IT, Affymetrix, seguindo as instruções dos fornecedores. O sequenciamento dos fragmentos de PCR foi feito em reação clássica utilizando os kits de sequenciamento da Applied Biosystems ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit versão 3.1, utilizando as recomendações do Kit.

#### *- Análises filogenéticas*

A análise das sequências obtidas foram realizadas com a utilização de softwares específicos para gerar as árvores filogenéticas, disponíveis na internet para download gratuito. Para visualização do eletroferograma foi utilizado o Chromas Pro v. 1.5. Para montar a sequência consenso, o programa Geneious (BIOMATTERS - <http://www.geneious.com>) foi utilizado, observando-se os parâmetros de qualidade das sequências.

Cada sequência consenso foi então submetida à busca por similaridade no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), para observar se as sequências geradas correspondem às regiões desejadas, através da similaridade com outras sequências depositadas no banco de dados. Sequências de 28S e ATP6 de espécies das ordens *Phallales* foram retiradas do GenBank para as análises filogenéticas. As espécies utilizadas como grupo externo foram escolhidas baseadas em estudos anteriores (HOSAKA et al., 2006). Assim, tanto as sequências geradas, quanto as sequências retiradas do GenBank foram submetidas ao alinhamento para identificação de posições homólogas, no programa ClustalX v.2.0.9 (LARKIN et al., 2007), com as condições default do programa. A edição manual do alinhamento foi realizada com o programa BioEdit (HALL, 1999).

O primeiro passo para construção das árvores filogenéticas é a escolha do modelo de substituições que melhor se aplica aos dados, que será utilizado nos métodos de reconstrução. O MrModelTest (NYLANDER, 2004), uma versão modificada, foi utilizado para análise Bayesiana, pois apresenta o resultado em bloco de comando para o MrBayes.

Para construção das árvores foi utilizada a análise Bayesiana através do programa MrBayes (HUELSENBECK e RONQUIST, 2001). As sequências foram concatenadas com o script concat.jar (SMITH e DUNN, 2008), após a escolha do modelo ter sido feita para cada gene em separado. No MrBayes, os dados foram particionados, com cada partição correspondendo a uma região gênica, com seu respectivo modelo de substituição escolhido pelo MrModelTest. Foram geradas 2 milhões de gerações em duas corridas, com quatro cadeias cada. As árvores foram amostradas a cada 1000 ciclos, com o quarto inicial descartado das análises (burn in=25%). Os valores de suporte foram obtidos pela distribuição das probabilidades posteriores (PP).

Para visualização e edição dos dendogramas, foi utilizado o TreeView (PAGE, 1996) e FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

## 6. Resultados

Ao todo foram coletadas 21 espécimes, compreendendo 8 espécies de *Phallales* da Amazônia Central. Todas foram incluídas na árvore filogenética.

O DNA extraído foi de boa qualidade, variando em quantidades de cerca de 20 a 89 ng/ $\mu$ l. As regiões ATP6 e nuc-LSU foram amplificadas e sequenciadas com sucesso, gerando sequências de até 650 pb para ATP6 e 900 pb para nuc-LSU, o que era esperado. A comparação das sequências obtidas neste trabalho com as do Genbank realizada através da ferramenta Blast confirmou que a região sequenciada era a de interesse. Após, as sequências do Genbank obtidas pelo blast foram baixadas; estas e as sequências geradas no presente trabalho foram alinhadas e editadas, formando dois blocos de alinhamento, um da região ATP6 e outro da região nuc-LSU. Cada bloco foi submetido ao teste do modelo evolutivo; para ambos os genes, o modelo escolhido pelo MrModelTest foi o *General Time Reversible*. Os dois blocos foram então concatenados para formar uma única matriz de dados, composta pelos dois genes, e submetidas a análise bayesiana no MrBayes com as condições de corrida seguindo Hosaka et al. (2006).

A árvore filogenética obtida corresponde a encontrada em Hosaka et al. (2006) nas posições das famílias, com clados bem definidos e bem suportados (valores de probabilidade posterior de no mínimo 0.68). Os principais clados correspondem as famílias *Trappeaceae*, *Claustulaceae*, *Clathraceae*, *Phallaceae*, *Lysuraceae* e *Protophallaceae*. Na análise Bayesiana, 20.000 árvores foram obtidas, porém 25% delas foram descartadas em um período de *burnin*, como indicado por Huelsenbeck e Ronquist (2001). A Figura 01 corresponde a árvore consenso calculada com o restante das árvores.



Figura 1 Árvore filogenética da ordem *Phallales* obtida por análise Bayesiana. Em vermelho os espécimes coletados para este trabalho. Os números nos nós são valores de probabilidade posterior.

## 7. Discussão

A árvore filogenética reconstruída mostrou topologia semelhante a já existente definida por Hosaka et al. (2006). Porém, com a inserção de espécies amazônicas, algumas diferenças podem ser observadas.

### Família Phallaceae

Descrita por Corda (1842), *Phallaceae* é uma família bem definida e compreende os fungos *stinkhorns*, que recebem esse nome por exalarem odor fétido do basidioma maduro (ALEXOPOULOS et al., 1996). De uma forma geral, os gêneros dessa família compartilham caracteres como o corpo de frutificação como um estipe cilíndrico único, oco e com cavidades, com a gleba cobrindo a superfície externa do ápice, que pode ser modificada ou com píleo campanulado; perídio com duas a três camadas, esporos elípticos cobertos por mucilagem. A diferença entre os gêneros consiste em detalhes peculiares, como a presença de um indúcio em *Dictyophora*, presença de uma caliptra no ápice em *Itajahya*, ausência de indúcio em *Phallus*, gleba formando uma constrição perto do ápice do estipe em *Staheliomyces*, e o ápice modificado em *Mutinus*. Cunningham (1942) considerava sete gêneros: *Dictyophora*, *Itajahya*, *Phallus*, *Mutinus*, *Staheliomyces*, *Aporophallus* e *Floccomutinus*. No entanto, Kreisel (1996) sinonimizou os gêneros *Dictyophora*, *Aporophallus*, *Itajahya*, *Echinophallus* e *Endophallus* (ZANG E PETERSEN, 1989), incluindo-os em *Phallus*.

Com a inclusão de alguns representantes Neotropicais da família *Phallaceae*, pode-se observar na Figura 01 a formação de um clado composto pelas espécies *Staheliomyces cinctus* e *Xylophallus xylogenus*, que forma um grupo irmão das outras espécies incluídas na família *Phallaceae*. Estas duas espécies compõem gêneros monotípicos, ou seja, gêneros com uma única espécie, e para ambos só existem registros na América Central e norte da América do Sul. Apresentam características bem peculiares e diferentes dos outros gêneros da família: *Staheliomyces* possui a gleba localizada em uma constrição perto do ápice e pseudoestipe perfurado (Figura 03); enquanto *Xylophallus* não possui poro no ápice, possui tamanho diminuto (até 1,5 cm), o píleo é contínuo com o pseudoestipe, o qual é composto por cavidades alveolares (Figura 02). Devido a essas características distintas e a divergência encontrada na árvore filogenética, pode-se sugerir que o clado formado por esses dois gêneros compõe uma

nova família na ordem *Phallales*, porém mais espécimes precisam ser analisados e adicionados na árvore para dar maior robustez e conseqüentemente maior certeza.



Figura 2 Basidiomas da espécie *Xyllophallus xylogenus*. Foto: Tiara S. Cabral.

Outro clado bem suportado é do gênero *Phallus*. Esse gênero é o mais diverso da família, possuindo cerca de 18 espécies (KIRK et al., 2008), com distribuição pantropical. Kreisel (1996) sinonimizou vários outros gêneros da família, criando seções e subseções dentro do gênero *Phallus*. Uma dessas seções corresponde ao antigo gênero *Dictyophora*, caracterizado principalmente pela presença do indúcio (MILLER e MILLER, 1988). Na árvore filogenética obtida no presente trabalho, pode-se observar que as espécies que possuem indúcio (*Phallus cinnabarinus*, *Phallus indusiatus*, *Phallus merulinus*, *Phallus atrovolutus*) formam um grupo polifilético, indicando que o indúcio surgiu pelo menos duas vezes durante a evolução dentro do gênero *Phallus* (Figura 01). Isso corrobora a hipótese de Kreisel ao sinonimizar o gênero *Dictyophora* com *Phallus*, baseado na suposição de que o indúcio não é um caráter suficiente para separar os gêneros. Kreisel (1996) também criou a seção *Clautriavia* baseado na espécie *Phallus merulinus* (= *Clautriavia merulina*), para agrupar as espécies com receptáculo merulioide, ou seja, receptáculo com superfície granulosa. Na Figura 01, pode-se observar um clado formado por espécies tropicais com receptáculo merulioide (*Phallus*

*merulinus*, *Phallus atrovolvatus*), porém outras espécies que estão na seção não foram analisadas no trabalho. Apesar disso, esses resultados podem indicar que o caráter “receptáculo com superfície merulióide” surgiu apenas uma vez durante a evolução dentro do gênero, podendo servir de caráter diagnóstico para definir a seção *Clautriavia*.

Baseado na espécie *Itajahya galericulata*, Kreisel (1996) criou a seção *Itajahya* dentro do gênero *Phallus* para agrupar as espécies que possuem calíptra no píleo (Figura 03). Cabral et al. (2012) observaram que a espécie *Phallus roseus* (= *Itajahya rosea*) se agrupava separado de *Phallus*, concluindo então que tratava-se de um gênero separado, que tinha como caráter diagnóstico a presença de calíptra. Esse fato também foi observado por Trierveiler-Pereira et al. (2014), e no presente trabalho corroboramos essa hipótese.

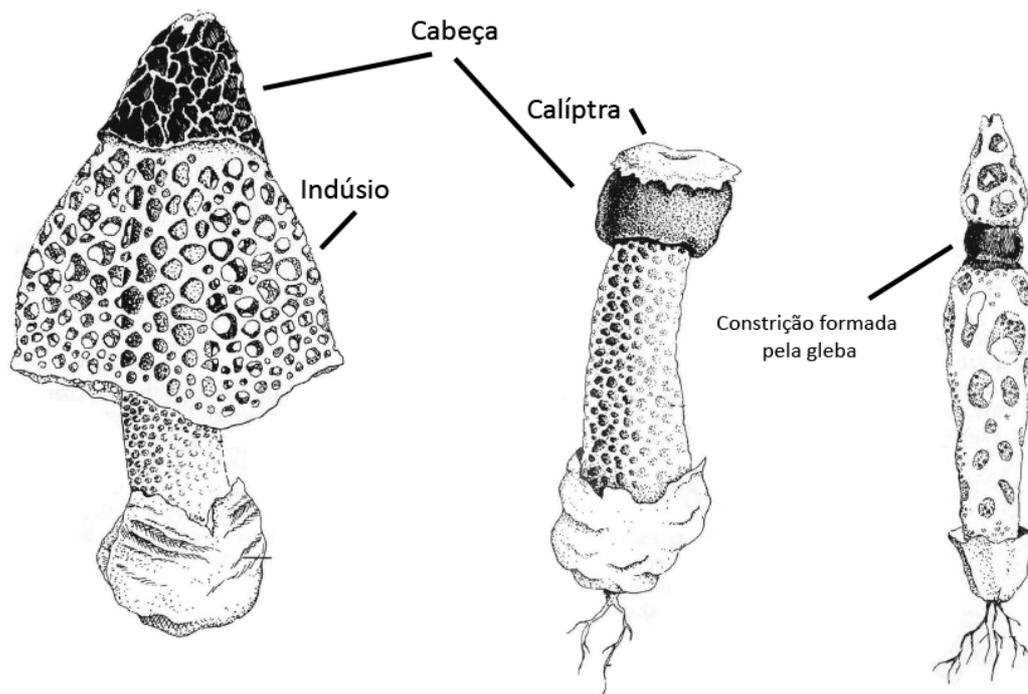


Figura 3 **A.** *Phallus indusiatus*; **B.** *Itajahya galericulata*; **C.** *Staheliomyces cinctus*. Adaptado de Miller e Miller, 1988.

A família *Lysuraceae* foi reconhecida por Corda (1842), mas vários autores subsequentes trataram como pertencendo a família *Clathraceae* (DRING, 1980; JÜLICH, 1981). Hosaka et al. (2006) com base em dados moleculares, observaram que os membros da antiga família *Lysuraceae* de fato formavam um clado separado de

*Clathraceae*, de modo que redefiniram então a família novamente. *Lysuraceae* engloba espécies com estipe alongado, com a gleba dividida por suturas no receptáculo.

A espécie *Aseroë arachnoidea* (Figura 04) foi coletada na Amazônia brasileira no presente trabalho, e o gênero *Aseroë* pertence a família *Clathraceae*. O gênero foi inicialmente proposto para acomodar a espécie *A. rubra* (LABILLARDIÈRE, 1806). Desde então foram descritas outras espécies, *A. arachnoidea* (FISCHER, 1890), *A. coccínea* (2007) e *A. floriformis* (2005), sendo esta última transferida para o gênero *Abrachium*, devido à ausência de braços (CABRAL et al., 2012). Esse gênero pode ser morfológicamente caracterizado pelo basidioma que emerge de uma volva branca, consistindo em um estipe cilíndrico com braços na margem do receptáculo divergindo com pontas livres, e a gleba localizada na superfície superior do disco dos braços, ou nos dois (Dring, 1980). Na árvore filogenética deste trabalho, a espécie *Aseroë arachnoidea* se agrupa na família *Lysuraceae*, ao invés de *Clathraceae* como esperado. Recentemente, Trierveiler-Pereira et al. (2014) também observaram esse fato e realocaram a espécie para o gênero *Lysurus*, de forma que atualmente essa espécie é considerada *Lysurus arachnoideus*. No presente trabalho também pode-se verificar que uma segunda espécie do gênero, obtida da coleção do herbário de Tottori Mycological Institute (TMI), denominada *Aseroë coccinea* também se agrupa na família *Lysuraceae* e portanto deve ser transferida de gênero.

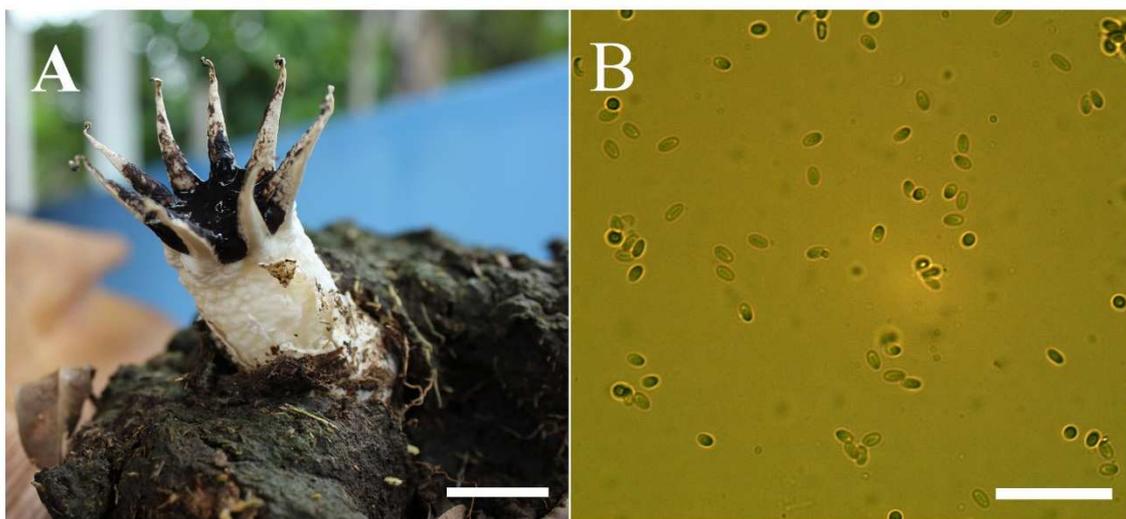


Figura 4 **A.** *Aseroë arachnoidea*; **B.** esporos em microscopia ótica. Foto: Tiara S. Cabral.

## 8. Conclusão

O presente trabalho demonstra a importância da inclusão de espécies pouco ou não representadas na filogenia de um grupo, principalmente para grupos onde a taxonomia alfa ainda é problemática. No caso dos *Phallales*, incluindo-se as espécies Neotropicais, pode-se observar alterações em nível de espécie, gênero e possivelmente família, os dados aqui relatados sugerem que:

- O clado formado por *Staheliomyces cinctus* e *Xylophallus xylogenus*, devido características distintas e a divergência encontrada na árvore filogenética, compõe uma nova família na ordem Phallales.
- Na seção Dictyophora (antigo gênero *Dictyophora*) a presença do indúcio era considerada como sendo uma característica diagnóstica do gênero, a análise filogenética mostra que as espécies que possuem essa característica formam um grupo polifilético, indicando assim que a presença do indúcio apareceu pelo menos duas vezes durante a evolução, corroborando com a hipótese de Kreisel.
- Na seção Clautriavia (antigo gênero *Clautriavia*) a presença do receptáculo merulioide poderia, de fato, servir de caráter diagnóstico para o gênero.
- A espécie *Aseroë coccinea* que pertencia a família Clathraceae de acordo com análises morfológicas, nas análises filogenéticas se agrupa na família Lysuraceae e, portanto deve ser realocada.

Porém, todos esses resultados somente serão confirmados com uma maior amostragem de espécimes e a adição na árvore para uma maior robustez dos dados.

## 9. Referências

- ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W. e BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. 4 ed. Nova Iorque: Wiley. 1996.
- BEGEROW, D.; NILSSON, H.; UNTERSEHER, M.; MAIER, W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 87, p. 99–108. 2010.
- BINDER, M.; BRESINSKY, A. Derivation of a polymorphic lineage of Gasteromycetes from boletoid ancestors. *Mycologia* 94: 85-98. 2002.
- CABRAL, T.S.; MARINHO, P.; GOTO, B.T.; BASEIA, I.G. *Abrachium*, a new genus in the Clathraceae, and *Itajahya* reassessed. *Mycotaxon*, in press.
- CALENDINI, F.; MARTIN, J.-F. PaupUP v1.0.3.1 A Free Graphical Frontend for Paup\* DOS Software. 2005.
- CARLILE, M. J., WATKINSON, S. C., GOODAY, G.W. *The fungi*. San Diego: Academic Press, 2001.
- CUNNINGHAM, G. H. A. *The Gasteromycetes of Australia and New Zealand*. Dunedin, N.Z.: Printed Privately by John McIndoe, 1942.
- DRING, DM. Contributions towards a rational arrangement of the Clathraceae. *Kew Bulletin*. v. 35, pp. 1-96, 1980.
- ELLIS, M. B.; ELLIS, J. P. *Fungi without gills (Hymenomycetes and Gasteromycetes) an identification handbook*. London: Chapman and Hall, 1990.
- BIOMATTERS, Geneious version R7 created by Biomatters; Auckland, New Zealand. Available from <http://www.geneious.com/>
- GUGLIOTTA, A.M; CAPELARI, M. Taxonomia de Basidiomicetos. In: Bononi, V. L. R.; Grandi, R.A.P. (Eds.). *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. Instituto de Botânica, São Paulo, SP. p.68-105. 1998.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, v. 41, p. 95-98, 1999.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, v. 111, p. 509-547, 2007.

HOSAKA, K. et al. Molecular phylogenetics of the gomphoid-phalloid fungi with an establishment of the new subclass Phallomycetidae and two new orders. *Mycologia*, v. 98, p. 949-959, 2006.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. R. MrBayes. Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, v. 17, p. 754-755, 2001.

KENDRICK, B. *The Fifth Kingdom*. Newburyport, MA: Focus Publishing, 2001.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. *Ainsworth e Bisby's Dictionary of the Fungi*, 10th ed. CAB Publishing, 655p, 2008.

KRETZER, A. M.; BRUNS, T. D. Use of *atp6* in fungal phylogenetics: An example from the Boletales. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 13, n. 3, p. 483-492. 1999.

KRÜGER, D.; BINDER, M.; FISCHER, M. e KREISEL, H. The Lycoperdales. A molecular approach to the systematics of some gasteroid mushrooms. *Mycologia* 93: 947-957. 2001.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

MATHENY, P.B.; CURTIS, J.M.; HOFSTETTER, V.; AIME, M.E.; MONCALVO, J.-M.; GE, Z.-W.; YANG, Z.-L.; SLOT, J.G.; AMMIRATI, J.F.; BARONI, T.J.; BOUGHER, N.L.; HUGHES, K.W.; LODGE, D.J.; KERRIGAN, R.W.; SEIDL, M.T.; AANEN, D.K.; DENITIS, M.; DANIELE, G.M.; DESJARDIN, D.E.; KROPP, B.R.; NORVELL, L.L.; PARER, A.; VELLINGA, E.C.; VILGALYS, R.; HIBBETT, D.S. Major clades of Agaricales: a multilocus phylogenetic overview. *Mycologia* 98: 982 – 995. 2006.

MILLER, O. K.; MILLER, H. *Gasteromycetes: morphological and developmental features, with keys to the orders, families, and genera*. Eureka, CA: Mad River Press, 1988.

MONCALVO, J.M.; VILGALYS, R.; REDHEAD, S.A.; JOHNSON, J.E.; JAMES, T.Y.; AIME, M.C.; HOFFSTETTER, V.; VERDUIN, S.J.W.; LARSSON, E.; BARONI, T.J.; THORN, R.G.; JACOBSSON, S.; CLÉMENÇON, H.; MILLER JR., O.K. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 357 – 400. 2002.

NYLANDER, J. A. A. MrModelTest v2. Program distributed by the editor., 2004.

PAGE, R. D. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Application in the Biosciences*, v. 12, p. 357–358, 1996.

PULLANDRE, N., LAMBERT, A., BROUILLET, S. AND ACHAZ, G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*. 2011.

SEIFERT, K. A. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*. v. 9 (Suppl. 1), p. 83–89. 2009.

SEIFERT, K. A.; SAMSON, R.A.; DEWAARD, J.R.; HOUBRAKEN, J.; LEVESQUE, C. A.; MONCALVO, J.M. LOUIS-SEIZE, G.; HEBERT, P. D. N. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Science*. v. 104, n. 10, p. 3901–3906. 2007.

SMITH, S. A.; DUNN, C. Phyutility: a phyloinformatics utility for trees, alignments, and molecular data. *Bioinformatics*, v. 24, p. 715-716, 2008.

STAMETS, P. *Mycelium running. How mushrooms can help save the world.* California: Ten Speed Press. 2005.

SWOFFORD, D. L. PAUP\*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods)*. Version 4.0 b. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 1998. 142p.

VIGALYS, R. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *The Journal of Bacteriology*, v. 172, n. 8, p. 4238-4246, 1990.

WEBSTER, J.; WEBER, R. *Introduction to fungi.* Cambridge; New York: Cambridge University Press, 2007.

WHITAKER R.H. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163: 150-160. 1969.

WHITE TJ, BRUNS TD, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A; Gelfand, D.H; Sninsky, J.J.; White, T.J. eds. *PCR protocols, a guide to methods and applications*. San Diego, California: Academic Press. p. 315-322. 1990.