

Gesieli Kaipper Figueiró

**ASPECTOS TAXONÔMICOS E FILOGENÉTICOS DE *Antrodia*  
*s.l.* COM A INCLUSÃO DE ESPÉCIMES DA REGIÃO  
NEOTROPICAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.  
Orientador: Prof. Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos. Coorientador: Dr. Gerardo Lucio Robledo.

Florianópolis

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kaipper-Figueiró, Gesieli Kaipper Figueiró  
Aspectos Taxonômicos e Filogenéticos de *Antrrodia* s.l.  
com a inclusão de espécimes da Região Neotropical /  
Gesieli Kaipper Figueiró Kaipper-Figueiró ; orientador,  
Elisandro Ricardo Drechsler-Santos ; coorientador,  
Gerardo Robledo. - Florianópolis, SC, 2015.  
66 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. *Antrrodia*. 3.  
Fungos causadores de podridão marrom "brown-rot". 4.  
Fungos Poliporoides. 5. Sistemática . I. Drechsler-Santos,  
Elisandro Ricardo . II. Robledo, Gerardo. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

**“Aspectos taxonômicos e filogenéticos de  
Antrodia s.l. com a inclusão de espécimes da  
região Neotropical”**

por

**Gesieli Kaipper Figueiró**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 21/PPGFAP/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos (Presidente/UFSC)



Prof. Dr. Gilberto Coelho (UFSC)



Profa. Dra. Andréa Romero (Universidade de Buenos Aires/CONICET)



Profa. Dra. Mayara Caddah (CCB/UFSC)



Prof. Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos,  
Algas e Plantas

Florianópolis, 12 de junho de 2015.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Ricardo e Gerardo, pelo aprendizado, confiança e disponibilidade durante esses dois anos, não tenho palavras para agradecer-los;  
Aos professores do programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas pelo conhecimento transmitido durante a realização das disciplinas;  
Agradeço aos curadores dos Herbários CORD, FLOR, IBOT e URM, pelos empréstimos de materiais;

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Maria Alice pelo conhecimento transmitido e por todas as conversas e experiências no micolab;

Ao Mateus Arduvino Reck pela amizade, aprendizado e disponibilidade para me ajudar sempre;

Ao Dr. Aristóteles Góes Neto, que por meio do projeto “FungiBrBol” forneceu subsídios indispensáveis para a execução das análises moleculares deste trabalho;

Agradeço imensamente a Val, Diogo e Carlos que tiveram toda a paciência do mundo me ensinando as coisas mais básicas e lindas sobre o mundo dos Fungos;

Também sou grata aos colegas do Micolab pela amizade e carinho de sempre, compartilhando momentos de alegrias e tristezas, almoços de domingos e todas as datas comemorativas que passamos longe da nossa família;

Agradeço a CAPES pelo auxílio financeiro durante esses dois anos;

Agradeço à Nataly e a Valéria que gentilmente me receberam em Córdoba e foram ótimas parceiras;

Agradeço à Meli, pela amizade e todos os momentos que compartilhamos morando juntas;

Ao Fernando e à Raquel que foram meus irmãozinhos micológicos e juntos compartilhamos momentos incríveis durante esses dois anos;

As minhas irmãs por opção Caroll, Luci e Sindy pela amizade que supera a distância;

A minha família que é a minha base, principalmente ao meu Vô Nilo que sempre me deu toda a ajuda necessária pra eu chegar até aqui;

A minha mãe pelo coração gigante que tem e amor incondicional;

Aos meus irmãos Geferson (Nego), Ari e Su por me apoiarem sempre;

Ao tio Zico e Cléo pelo carinho especial e por sempre estarem disponíveis quando eu preciso de ajuda;

Ao Alex pelo amor, parceria, paciência e cumplicidade, eu te amo;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho,

Muito obrigada!!!

Mire e veja: o mais importante e bonito, do mundo,  
é isto: que as pessoas não estão sempre iguais,  
ainda não foram terminadas – mas que elas vão  
sempre mudando, afinam ou desafinam...

(Guimarães Rosa)

## RESUMO

*Antrodia* é um gênero caracterizado por apresentar basidiomas ressupinados a pileados, sazonais a perenes, dimíticos, com hifas generativas fibuladas, basidiósporos cilíndricos a elipsoides de parede delgada, lisos e inamiloides (IKI-). Amplamente distribuído, principalmente nas zonas temperadas da América do Norte e Europa em florestas de coníferas, compreende exclusivamente espécies causadoras de podridão marrom (*brown-rot*). Estudos com filogenias moleculares têm demonstrado *Antrodia* como um gênero polifilético, com ampla variação morfológica. Este trabalho representa uma contribuição para o conhecimento de espécies pertencentes ao “clado antrodia” com ênfase nas espécies coletadas na região Neotropical. Além disso, a partir de análises morfológicas, moleculares (ITS) e de dados ecológicos, foi possível reconhecer uma nova espécie de *Antrodia* s.s. ocorrendo principalmente em *Baccharis uncinella*. Através das análises moleculares foi possível identificar o posicionamento filogenético de espécies pertencentes ao “clado antrodia” como: *Antrodia malicola*, *Daedalea ryvardeniana*, *Amyloporia sinuosa*, *Fomitopsis meliae* e *Fomitopsis palustris*. Com base nos resultados obtidos neste estudo, percebe-se que existem inúmeras novidades científicas, tanto a nível específico como genérico, no entanto, o uso de múltiplos marcadores moleculares faz-se necessário para melhor delimitação e proposição destes táxons.

**Palavras-chave:** Clado antrodia, Taxonomia de Políporos, Sistemática filogenética.

## ABSTRACT

*Antrodia* is a genus characterized by a basidiomata resupinate to pileate, seasonal to perennial growth habit, a dimitic hyphal system with clamped generative hyphae, and hyaline, smooth, thin-walled and usually cylindrical to oblong-ellipsoid basidiospores which are negative in Melzer's reagent. Widely distributed, mainly in the temperate zones of North America and Europe in coniferous forests, includes only species causing brown-rot. Studies with phylogenetic analyzes have shown *Antrodia* as a polyphyletic genus with wide morphological variation. This work represents a contribution to the knowledge of species belonging to the "antrodia clade", with emphasis on species collected in Neotropical region. Furthermore, based on morphological, molecular (ITS) and ecological data, it was also possible to recognize a new species of *Antrodia* s.s. occurring mainly on *Baccharis uncinella*. Through molecular analyses it was possible to identify the phylogenetic position of species belonging to the antrodia clade as: *Antrodia malicola*, *Daedalea ryvardeana*, *Amyloporia sinuosa*, *Fomitopsis meliae* e *Fomitopsis palustris*. Based on the results obtained in this study, we realize that there are numerous scientific novelties, specific and generic. However the use of multiple molecular markers is necessary for best definition and propose these taxa.

**Keywords:** Antrodia clade, Taxonomy of polypores. Phylogenetic systematic.

## SUMÁRIO

<b>1. APRESENTAÇÃO</b> .....	10
<b>2. INTRODUÇÃO</b> .....	11
2.1 Fungos Poliporoides Causadores de Podridão Marrom ( <i>Brown-rot</i> ) .....	11
2.2 Histórico do conceito <i>Antrodia</i> .....	11
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	14
3.1 Objetivo Geral .....	14
3.2 Objetivos Específicos .....	14
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
4.1 Coletas e processamento dos Materiais .....	15
4.2 Análises Morfológicas .....	15
4.3 Análises Moleculares .....	16
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	17
Capítulo I - .....	19
Capítulo II - .....	34
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	60
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura I. Árvore filogenética do “*core antrodia group*” gerada a partir de seqüências de ITS com análises de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança. Os valores de suporte apresentados nos ramos considerados significativos foram IB ( $\geq 0.95$ ) e BS ( $\geq 70$ ).....33

### CAPÍTULO II

Figure I. Phylogenetic relationships of members of the “*Antrodia s.s. clade*” inferred from the analyses of the dataset (ITS rDNA sequences). Topology from ML and BPP analysis. Support values along branches are BPP and ML ( $\geq 70$ ) and PP ( $\geq 0.95$ ) respectively.....56

Figure II. *Antrodia neotropica* – a: typical habitat and host/substrate (*Baccharis uncinella*); b: general view of basidiomata and aspect of *brown-rot* degradation caused on wood (DS1103); c: primordial, resupinate and withish basidiome with round pores (GKF053); d: mature, resupinate and pale brownish basidiome with elongate and lacerate pores (GKF 049); e: resupinate to effused-reflexed basidiome (DS1098) (scale bars = 1 cm); f: microscopy morphology of basidia and hyphae (arrow are indicating the skeletal hyphae apex and camped basidiole – GKF 053); g. basidiospores (DS1107), in detail the apiculous and concavity suprahylar indicated by arrows; and h. Basidiospores (DS1107), in dorsal, ventral and lateral view (scale bars = 10  $\mu\text{m}$ ).....57

Figure III. Microscopical features of *Antrodia neotropica. holotype. G.Kaipper-Figueiró* 44 (FLOR). a: basidiospores. b: schematic section through basidiome showing a basal layer dominated by generative hyphae arranged more or less parallel, an intermediate layer of interwoven skeletal hyphae, and finally the trama dominated by skeletal hyphae parallelly arranged. c: skeletal hyphae.....58

Figure IV. Comparison of basidiospores size average of specimens and species of *Antrodia s.s.* (see also TABLE II). ● = *A. neotropica* (An), ■ = *A. heteromorpha* (Ah), ▲ = *A. serpens* (As), ● = *A. mappa* (Am), ★ = *A. macra* (Am), — = *A. favescescens* (Af), ◆ = *A. tanakai* (At). Larger symbols represent the arithmetic means of the individuals average. Error bars around larger symbols correspond to Standard Deviation. Shaded area indicates *A. heteromorpha* complex.....59

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I.

Tabela de Espécies Sequenciadas.....32

### CAPÍTULO II.

Table I. List of species, collections, and sequences used in the phylogenetic analyses.....52

Table II. Basidiospores size in the *Antrodia* species. Values for *Antrodia neotropica* specimens are based in n=40. T = type specimen \* = average values taken from Spirin et al. (2013).....55

## 1. APRESENTAÇÃO

Este trabalho representa uma contribuição para o conhecimento de fungos causadores de podridão marrom (*brown-rot*) na região Neotropical. É apresentada uma filogenia preliminar de fungos pertencentes ao “clado antrodia”, bem como a proposição de uma nova espécie pertencente ao gênero *Antrodia* s.s. Os resultados e a discussão estão subdivididos em capítulos, onde:

O capítulo I apresenta uma filogenia geral de fungos *brown-rot*, com a inclusão de espécimes coletados no Brasil e Argentina, bem como uma breve discussão sobre os agrupamentos formados baseando-se em outros trabalhos realizados;

O capítulo II apresenta a proposição de uma espécie nova (*Antrodia neotropica* Ad int.), com base em dados morfológicos, moleculares e ecológicos, e uma chave de identificação para as espécies de *Antrodia* s.s. (Artigo submetido para a revista *Mycologia*).

## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1 FUNGOS POLIPOROIDES CAUSADORES DE PODRIDÃO MARROM (*Brown-rot*)

Polyporales Gäm é um grupo diverso que inclui aproximadamente 1800 espécies descritas (Kirk et al. 2008). A maioria dos fungos pertencentes a esta ordem é saprotrófico e utiliza a madeira para sua reprodução. Outros, no entanto, são patógenos de plantas e causam danos à madeira e prejuízos econômicos como, por exemplo: *Fomitopsis* P. Karst., *Ganoderma* P. Karst. *Phaeolus* (Pat.) Pat. (Zhou et al. 2014). Tradicionalmente os fungos degradadores de madeira são divididos em dois grupos: os causadores de podridão branca (*white-rot*), que são capazes de degradar todos os componentes da madeira (lignina e compostos celulósicos), e os causadores de podridão marrom (*brown-rot*), que degradam somente compostos celulósicos da madeira (celulose e hemicelulose) deixando a lignina levemente modificada no substrato (Floudas et al. 2012). Dentre os fungos causadores de podridão marrom (*brown-rot*) na madeira, a família mais representativa é Fomitopsidaceae Jülich com aproximadamente 24 gêneros e 197 espécies descritas (Kirk et al. 2008). Seus membros são caracterizados por apresentarem basidiomas sazonais a perenes, ressupinados a pileados, consistência frágil (suave) a coriácea, com poros regulares a irregulares. Micromorfológicamente podem ser dimíticos a trimíticos, com hifas generativas fibuladas, basidiósporos hialinos, lisos, variando desde alantoides, cilíndricos a elipsoides. É amplamente distribuído principalmente nas zonas temperadas da região holártica, onde algumas espécies se destacam por serem importantes patógenos florestais, causando grandes prejuízos econômicos como, por exemplo: *Daedalea quercina* (L.) Pers., *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. e *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst, que atacam a madeira de várias espécies arbóreas importantes (*Salix caprea* L., *Quercus* L., *Larix* Mill., *Pinus* L.) (Cannon and Kirk 2007, Kim & Jung 2000).

### 2.2 HISTÓRICO DO CONCEITO *Antrodia*

*Antrodia* P. Karst., reconhecido como um dos principais gêneros causadores de podridão marrom (*brown-rot*), foi descrito por Karsten (1879) para acomodar espécies com basidiomas ressupinados a efusos. Este gênero apresenta um histórico marcado por mudanças e reformulações taxonômicas. Em 1905, Murrill, não considerando

*Antrodia*, tratou as espécies do gênero como *Coriolellus* Murrill somente após a revisão realizada por Donk em 1964 é que o nome *Antrodia* passou a ser utilizado novamente, e seis novas combinações foram propostas, ampliando a circunscrição morfológica do gênero e designando *Antrodia serpens* (Fr) P. Karst. como tipo nomenclatural (Binder et al. 2005).

Ryvarden (1991) fez uma importante revisão sobre os fungos poliporoides e atribuiu peso taxonômico para diferentes caracteres morfológicos, como sistema hifal e tipo de podridão causada na madeira. Desde então, *Antrodia* passou a ser caracterizado por apresentar espécies com basidiomas ressupinados a efuso-reflexos, raramente pileados, sazonais a perenes, dimíticos, com hifas generativas fibuladas, basidiósporos cilíndricos a elipsoides de parede delgada, lisos e inamiloides (IKI-). É amplamente distribuído, principalmente nas zonas temperadas da América do Norte e Europa em florestas de coníferas, compreendendo exclusivamente espécies causadoras de podridão marrom. Nesta mesma obra o autor ainda sinonimizou *Amyloporia* Singer e *Fibroporia* Parmasto em *Antrodia* por apresentarem afinidade morfológica (Ryvarden 1991, Ryvarden & Gilbertson 1993).

No entanto, estudos com filogenia molecular têm demonstrado *Antrodia* como um gênero polifilético, visto que as espécies se distribuem em clados distintos, com ampla variação morfológica (SY Kim et al. 2001, 2003, Chiu 2007, Yu et al. 2010, Rajchenberg et al. 2011, Bernicchia et al. 2012, Cui 2013, Cui et al. 2011, Spirin et al. 2012, Spirin et al. 2013, Cui & Dai 2013, Li & Cui 2013a, Li & Cui 2013b). O termo “antrodia clade” foi introduzido por Hibbett & Donoghue (2001) como um subgrupo do “polyporoid clade” para designar um agrupamento de gêneros causadores de podridão marrom. De acordo com filogenias moleculares recentes, aproximadamente 26 gêneros pertencem a este clado, distribuídos em cinco grupos principais: *Fibroporia*, *Laetiporus* Murrill, *Postia* Fr., *Laricifomes* Kotl. & Pouzar e *Antrodia*. *Fibroporia* é corroborado como um gênero monofilético, *Laetiporus* apresenta bons valores de suporte, porém tem baixa amostragem, e os demais clados *Postia*, *Laricifomes* e *Antrodia* não apresentam resolução, sendo necessário ampliar os estudos para corroborar os mesmos (Ortiz-Santana et al. 2013).

Recentemente Spirin et al. (2013), utilizando análises morfológicas e diferentes marcadores moleculares (ITS, LSU e *tef1*), propuseram *Antrodia sensu stricto*, a partir do posicionamento da espécie tipo do gênero (*A. serpens* (Fr.) P. Karst.), como sendo um grupo pequeno de espécies pertencentes ao “*Antrodia heteromorpha complex*” proposto por Ortiz-Santana et al. (2013). Neste mesmo trabalho os autores

propõem que existe sobreposição de caracteres e que encontrar uma característica exclusiva do gênero não tem sido uma tarefa fácil. A maioria das espécies de *Antrodia s.s.* são descritas como restrita às regiões temperadas da América do Norte (*A. favescens*), Europa (*A. serpens* tipo do gênero) ou amplamente distribuída no hemisfério Norte ocorrendo principalmente em florestas de coníferas (*A. heteromorpha*) (Spirin et al. 2013). No entanto, espécimes identificados como *A. albida* (Fr.) Donk (= *A. heteromorpha*) tem sido recorrentemente coletados, principalmente em substratos de Angiospermas na Mata Atlântica do Brasil (Meijer 2006, Drechsler-Santos et al. 2008, Reck & Silveira 2008, Leal & Gugliotta 2008, Trierveiler-Pereira et al., 2009, Baltazar et al. 2009). Além disso, novas espécies continuam sendo propostas para o gênero, mas apesar de ser embasada em dados moleculares, a classificação genérica ainda permanece incerta, principalmente devido à ausência de caracteres morfológicos que corroborem a circunscrição taxonômica desses gêneros (Bernichia et al. 2012, Cui 2013, Cui & Dai 2013, Drechsler-Santos et al. 2012, Li et al., 2013b, Li & Cui 2013, Spirin et. al, 2013).

Estudos com o objetivo de compreender as relações filogenéticas entre *Antrodia s.l.* e demais gêneros *brown-rot* como *Daedalea* e *Fomitopsis* nos permitirá reconhecer novas espécies ocorrentes na região Neotropical. Além disso, a partir das análises detalhadas da morfologia, análises moleculares e dados sobre a distribuição geográfica poderiam nos auxiliar na compreensão dos padrões de especiação e dispersão das espécies pertencentes a este clado.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é estudar filogeneticamente espécies pertencentes ao “*core antrodia group*” proposto por Ortiz-Santana et al. 2013, que ocorrem no Brasil e Argentina.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e identificar morfológicamente materiais do Brasil e Argentina a partir de espécimes representativos, incluindo materiais tipo (quando possível) e de referência;
- Extrair, amplificar e sequenciar a região ITS do rDNA nuclear de materiais coletados e de referência;
- Interpretar as espécies a partir das análises moleculares, levando em consideração dados morfológicos e ecológicos (distribuição geográfica e hospedeiro), bem como descrever as novidades científicas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETAS E PROCESSAMENTO DOS MATERIAIS

Foram estudados espécimes de *Antrodia s.l.* coletados na Mata Atlântica (SC, RS), e em outros biomas como Cerrado (MT) e Yungas Argentinas, tanto realizadas para esse trabalho como por colaboradores. Foram solicitados empréstimos de materiais de referência depositados nos Herbários CORD, FLOR, IBOT e URM. Os basidiomas coletados foram levados para o laboratório e em seguida mantidos por 12 à 24h em estufa para desidratação (30° a 35°C), também foram armazenados fragmentos dos basidiomas em *ependorfs* com sílica, a fim de preservar o DNA para estudos moleculares. Todos os espécimes coletados estão depositados no Herbário FLOR. Os acrônimos dos herbários estão de acordo com a base de dados Index Herbariorum (Thiers, continuamente atualizado).

### 4.2 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

Para a descrição macroscópica foram observados: hábito de crescimento, tipo de podridão causada no substrato, sazonalidade, dimensões do basidioma, bem como caracteres do himenóforo (poros: formato e n° por milímetro). A determinação das cores foi realizada de acordo com o catálogo de Munsell (1975).

Para observação dos caracteres microscópicos foram realizados cortes dos basidiomas à mão livre para estudo do sistema hifal, presença ou ausência de elementos estéreis, basídios e basidiósporos. A descrição dos basidiósporos segue o modelo de Cléménçon (2012). Os cortes foram montados em lâminas e lamínulas com: KOH 2-3% (hidratante para observação da coloração das hifas e basidiósporos), Floxina 1% (corante para observar as características das hifas generativas, himênio e basidiósporos) e reagente de Melzer (para observar a presença ou ausência das reações dextrinoide e amiloide nas hifas e basidiósporos), foi utilizado Azul de Cresil para observar reação metacromática nas estruturas. Um fragmento do basidioma foi incubado por 24-48 horas em NaOH 3%, para posterior observação do sistema hifal em microscópio (Teixeira 1995). A observação e mensuração (n=40) das estruturas foram realizadas em microscópio óptico com ocular micrométrica, 5% das medidas de cada extremo são apresentadas entre parênteses.



### 4.3 ANÁLISES MOLECULARES

As análises moleculares serão apresentadas no item Material e Métodos dos Cap. 1 e 2.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao todo foram revisados 55 espécimes, representando 11 espécies pertencentes ao “*core antrodia group*”, oriundos de coletas realizadas para este ou para trabalhos paralelos e de coleções de Herbário.

De modo geral, os resultados e a discussão são apresentados de forma separada em capítulos, onde:

O capítulo I apresenta uma hipótese filogenética de fungos *brown-rot* a partir da inclusão de amostras do Brasil e Argentina, além disso, uma breve discussão sobre o posicionamento destes espécimes no clado “*core antrodia group*”, *sensu* Ortiz-Santana et al. (2013).

O capítulo II apresenta a proposição de uma espécie nova (*Antrodia neotropica* *Ad int.*), com base morfológica e molecular, bem como uma chave de identificação para as espécies de *Antrodia sensu stricto* (Artigo submetido para a revista *Mycologia*).

**CAPÍTULO I – Aspectos Filogenéticos de *Antrodia s.l.* com a  
inclusão de Espécimes da Região Neotropical**

## Aspectos Filogenéticos de *Antrodia s.l.* com a inclusão de Espécimes da Região Neotropical

### INTRODUÇÃO

O termo “antrodia clade” foi introduzido por Hibbett & Donoghue (2001) para designar um agrupamento de 14 espécies que produzem podridão marrom (*brown-rot*) na madeira. A principal característica dos fungos causadores de podridão marrom (*brown-rot*) é a sua habilidade de remover seletivamente celulose e hemicelulose da madeira, deixando a lignina levemente modificada e conseqüentemente causando uma coloração marrom e um aspecto cúbico na madeira (Floudas et al. 2012). Esse grupo desempenha um importante papel ecológico, visto que a maioria das espécies são importantes patógenos (*Fomitopsis* P. Karst., *Laetiporus* Murrill, *Phaeolus* (Pat.) Pat. spp.) e decompositores de madeira, influenciando diretamente na estrutura e sucessão ecológica das florestas (Gilbertson & Ryvardeen 1986, Dai et al. 2007, Holmquist et al. 2009). Além disso, muitas espécies pertencentes a este grupo têm sido fonte de alimento e uso biotecnológico nas indústrias (Vaidya & Singh 2012).

Membros do “clado antrodia” tem sido foco de muitas pesquisas para avaliar suas relações filogenéticas, principalmente no que diz respeito à delimitação de gêneros e espécies (SY Kim et al. 2001, 2003, KM Kim et al. 2005, 2007, Desjardin et al. 2004, Blanco-Dios et al. 2006, Chiu 2007, Lindner & Banik 2008, Yu et al. 2010, Banik et al. 2010, 2012, Garcia-Sandoval et al. 2011, Lindner et al. 2011, Rajchenberg et al. 2011, Zhou & Wei 2012, Bernicchia et al. 2012, Spirin et al. 2012, 2013, Ortiz-Santana et al. 2013). Entre os principais gêneros estão: *Antrodia* P. Karst., *Auriporia* Ryvardeen, *Daedalea* Pers., *Fomitopsis*, *Laetiporus*, *Oligoporus* Bref, *Postia* Fr., *Neolentiporus* Rajchenb., *Phaeolus*, *Piptoporus* P. Karst. e *Sparassis* Fr. A grande maioria dos fungos causadores de podridão marrom tem sido registrada como ocorrente em áreas temperadas nas florestas de coníferas da América do Norte e Europa (Gilbertson 1980). Na região Neotropical e especificamente na América do Sul pouco se conhece a respeito da diversidade desse grupo de fungos. Para o Brasil, considerando alguns estudos de levantamento da micota (Groposo & Loguercio-Leite 2005, Drechsler-Santos et al. 2008, Baltazar & Gibertoni 2009, Gomes-Silva & Gibertoni 2009, Gibertoni & Drechsler-Santos 2010), a maioria dos degradadores de madeira causa podridão branca na madeira, enquanto os fungos *brown-rot* sempre representam uma

proporção menor de espécies registradas. O principal objetivo deste trabalho foi realizar análises filogenéticas preliminares das espécies de fungos *brown-rot*, incluindo espécimes coletados no Brasil e Argentina, afim de verificar o posicionamento filogenético dos mesmos na filogenia mais recente de fungos *brown-rot*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os doze espécimes sequenciados para este estudo foram coletados nos domínios Mata Atlântica (SC), Cerrado (MT) e Yungas Argentinas (ARG) (Tabela I). Os espécimes foram depositados nos Herbários CORD e FLOR.

Para a descrição macroscópica foi observado o hábito, tipo de podridão causada no substrato, sazonalidade, dimensões do basidioma, bem como caracteres do himenóforo (poros: formato e nº por milímetro). A determinação das cores foi realizada de acordo com o catálogo de Munsell (1975).

Para observação dos caracteres microscópicos foram realizados cortes dos basidiomas à mão livre para estudo do sistema hifal, presença ou ausência de elementos estéreis, basídios e basidiósporos. A descrição dos basidiósporos segue o modelo de Cléménçon (2012). Os cortes foram montados em lâminas e lamínulas com: KOH 2-3% (hidratante para observação da coloração das hifas e basidiósporos), Floxina 1% (corante para observar as características das hifas generativas, himênio e basidiósporos) e reagente de Melzer (para observar a presença ou ausência das reações dextrinoide e amiloide nas hifas e basidiósporos), foi utilizado Azul de Cresil para observar reação metacromática nas estruturas. Um fragmento do basidioma foi incubado por 24-48 horas em NaOH 3%, para posterior observação do sistema hifal em microscópio (Teixeira 1995). A observação e mensuração (n=40) das estruturas foram realizadas em microscópio óptico com ocular micrométrica, 5% das medidas de cada extremo são apresentadas entre parênteses.

Para as análises moleculares foram realizadas a extração e amplificação do rDNA dos materiais a partir do Protocolo de Góes-Neto et al. (2005). Para amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do rDNA, foi utilizado os pares de primers (ITS8-F/ITS6-R) (Dentinger et al. 2010). O sequenciamento foi realizado no Sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) do Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz - Belo Horizonte/MG. As sequências foram editadas manualmente com o *software* Geneious (Biomatters). Foi montada uma matriz (ITS) contendo sequências geradas por este trabalho

e outras disponíveis no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). O alinhamento foi realizado com o *software* MAFFT 7 (Kato et al. 2013), seguindo a estratégia Q-INS-I e inspecionados manualmente no *software* MEGA v.6 (Tamura et al. 2013). O melhor modelo evolutivo foi selecionado com o critério BIC (Bayesian Information Criterion) com o *software* Jmodeltest (Guindon & Gascuel 2003, Darriba et al. 2012). A análise de Inferência Bayesiana (IB) foi realizada com o *software* MrBayes v.3.1.2 utilizando a plataforma Cipres (Science Gateway, Miller & al. 2010; <http://www.phylo.org/>) e para a análise de Máxima Verossimilhança (ML) foi utilizado o *software* PhyML v.3.0, disponível na plataforma Phylogeny ([http://phylogeny.lirmm.fr/phylo\\_cgi/index.cgi](http://phylogeny.lirmm.fr/phylo_cgi/index.cgi)).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Doze sequências foram geradas para este estudo. A matriz final foi construída contendo 199 terminais, totalizando 644 pares de bases (incluindo gaps) dos quais 249 foram constantes, 372 variáveis e 299 parcimônio-informativos. O melhor modelo de evolução de nucleotídeos foi TPM2uf+I+G, sendo que a frequência das bases foram: freqA=0.23, freqC=0.19, freqG=0.21, freqT=0.37. Apenas a topologia da análise de Inferência Bayesiana é apresentada, com os valores de bootstrap (BS) e de probabilidade posterior (pp) mostrados nos nós da árvore (Fig. 1). Foram considerados significativos os ramos que apresentaram valores de pp  $\geq 0.90$  e BS  $\geq 70\%$ . Assim como apresentado e denominado no trabalho de Ortiz-Santana et al. (2013), o *core antrodia group*, com a inclusão de pelo menos sete gêneros de *brown-rot* foi reconstruído.

Os ramos terminais obtiveram bons valores de suporte, no entanto, nos ramos basais, percebe-se que as relações entre os gêneros ainda carecem de uma melhor delimitação. O marcador utilizado (ITS), tem se mostrado eficiente para resolução nos ramos terminais e principalmente para relações entre espécies, porém não se mostrou efetivo para a inferência das relações evolutivas dos ramos basais, ou seja, da relação intergenérica dos representantes do referido clado.

Para apresentar e discutir os resultados obtidos nesta filogenia tanto clados monofiléticos como clados politômicos, serão tratados aqui como grupo de espécies.

Grupo *Amyloporia* – Nesta filogenia *Amyloporia* Bondartsev & Singer ex Singer é composto por vários clados bem suportados de *Amyloporia s.l.*, mas que apresentaram-se em forma de politomias.

Trabalhos realizados por Binder et al. (2005) e Rajchenberg et al. (2011) rejeitam a monofilia deste gênero.

A maioria das espécies de *Amyloporia* foram descritas originalmente para a região holoártica, como *A. alpina* (Litsch.) Domanski, *A. carbonica* (Overh.) Vampola & Pouzar, *A. crassa* (P. Karst.) Bondartsev & Singer ex Bondartsev, *A. sinuosa* (Fr.) Rajchenb., Gorjón & Pildain e *A. xantha* (Fr.) Bondartsev & Singer e *A. carbonica* (Overh.) Vampola & Pouzar. As relações filogenéticas entre *Amyloporia* e *Antrodia* também foram investigadas por Rajchenberg et al. (2011), e novas combinações foram propostas em *Amyloporia*: *Amyloporia stratosa* (J.E. Wright & J.R. Deschamps) Rajchenb., Gorjón & Pildain e *Amyloporia sinuosa*. Neste trabalho, os autores enfatizaram o uso de caracteres de cultivo e a quantidade de núcleos por basidiósporos como fundamentais para a separação de *Antrodia s.l.* em: *Antrodia s.str.*, *Amyloporia* e *Fibroporia*. Em nossas análises foi possível identificar agrupamentos bem suportados como: *Amyloporia carbonica* (pp=1 BS=99), *Antrodia sinuosa* (pp=1 BS=99), *Rhodonía* Niemelä (pp=1 BS=100) e *Amyloporia xantha complex (sensu* Ortiz-Santana et al. 2013) (pp=1 BS=98) que se dispuseram de modo politômico, dificultando o entendimento de suas relações filogenéticas. No trabalho realizado por Ortiz-Santana et al. (2013), espécies pertencentes ao gênero *Rhodonía* (Tipo: *Postia placenta*) formaram um clado bem suportado juntamente com outras espécies de *Amyloporia*, separado das demais espécies de *Postia* e *Oligoporus*, enfatizando a necessidade de uma revisão nomenclatural. *Amyloporia sinuosa*, originalmente foi descrita a partir de espécimes da Europa. Uma amostra coletada durante a realização deste trabalho que foi identificada como *A. cf. sinuosa* (KF29ITS\_GKF52), agrupou-se juntamente com amostras oriundas da Europa. Morfologicamente esta espécie não apresenta nenhuma diferença dos espécimes europeus e a sua ampla distribuição geográfica pode estar relacionada com a sua ocorrência em hospedeiros exóticos (*Pinus* L.), onde frequentemente é encontrada. Mais espécimes devem ser coletados e sequenciados com o intuito de investigar a ocorrência natural deste táxon, além disso, comparações com materiais de referência (tipo) devem ser adicionados. Caracteres que vêm sendo utilizados como diagnósticos para o gênero, como hifas esqueléticas amiloides, devem ser reavaliados, pois nem todos os membros do gênero apresentam (Cui & Dai 2013).

Grupo *Antrodia sensu stricto* – O clado *Antrodia sensu stricto* (pp=1 BS=99), obtido nesta filogenia está de acordo com os resultados de Spirin et al. (2013) que, utilizando análises morfológicas e diferentes marcadores moleculares (ITS, LSU e *tef1*), propuseram *Antrodia s.s.*, a

partir do posicionamento da espécie tipo do gênero (*A. serpens* (Fr.) P. Karst.).

A maioria das espécies de *Antrodia s.s.* são descritas como restrita às regiões temperadas da América do Norte (*A. favescens*), Europa (*A. serpens*, tipo do gênero) ou amplamente distribuídas no hemisfério Norte, ocorrendo principalmente em florestas de coníferas (*A. heteromorpha*) (Spirin et al. 2013). Durante a realização deste trabalho, espécies coletadas na Mata Atlântica do Brasil identificadas previamente como *A. albida* (Fr.) Donk (= *A. heteromorpha*) (GKF44\_KF22, GKF49\_KF27, DS1386\_M10) foram sequenciadas e posicionaram-se no clado *Antrodia s.s.* Apesar destes táxons serem embasados em dados moleculares, a classificação filogenética de muitas destas espécies a nível de gênero ainda permanece incerta, principalmente devido à ausência de caracteres morfológicos que corroborem a circunscrição taxonômica do gênero. Sendo assim, este clado será discutido melhor no capítulo II.

Grupo *Antrodia pulvinascens* – Este grupo é representado por um clado, aqui denominado como *Antrodia pulvinascens* (pp=1 BS=100) que inclui: *A. mellita* Niemelä & Penttillä, *A. pulvinascens* (Pilát) Niemelä e *A. pulverulenta* B. Rivoire. Análises moleculares demonstram que *A. pulvinascens* e *A. pulverulenta* são estreitamente relacionadas. Morfologicamente, estas espécies apresentam basidiomas ressupinados e basidiósporos elipsoides (Spirin et al. 2012). Outra espécie similar a *A. pulvinascens* é *A. hyalina* Spirin, Miettinen & Kotir., recentemente descrita da Rússia. *Antrodia mellita* é caracterizada morfologicamente por apresentar basidiósporos cilíndricos com uma proeminente gútula. Macroscopicamente apresenta basidiomas resupinados e uma ampla distribuição nas áreas temperadas da Europa (Spirin et al. 2013).

Grupo *Antrodia malicola* – *Antrodia malicola* compreende *A. malicola* (Berk. & M.A. Curtis) Donk e *A. minuta* Spirin com bons valores de suporte (pp=1 BS=100). *Antrodia malicola* foi descrita a partir de materiais oriundos da América do Norte, com registro para o Japão e África, já *A. minuta* é conhecida até o momento apenas para a Rússia. Macroscopicamente *A. minuta* é facilmente reconhecida por ter basidioma pileado muito pequeno e poros pequenos (3-5/mm) (Spirin 2007). Materiais coletados na Argentina e Brasil (Santa Catarina), previamente identificados como *A. cf. malicola* (GKF67\_KF57ITS, ROBLEDO1311\_KF53ITS, ROBLEDO1192\_KF44ITS, ROBLEDO2253-KF45ITS) agruparam-se com os demais espécimes de diferentes regiões geográficas. Análises com mais marcadores moleculares são necessárias para melhor delimitação genérica deste clado.



Grupo *Antrodia serialis* – *Antrodia serialis* (pp=1 BS=98) inclui espécies de diferentes regiões geográficas e frequentemente associadas a Gimnospermas. Três clados foram identificados, um contendo *A. infirma* Renvall & Niemelä (pp=1 BS=100), descrita da Finlândia, o segundo contendo *A. serialis* (Fr.) Donk (pp=1) descrita da América do Norte e o terceiro contendo *A. variiformis* (Peck) Donk (pp=1 BS=99), também da América do Norte. Estas espécies se diferenciam morfológicamente na coloração dos seus basidiomas e tamanho dos seus basidiósporos (Yu et al. 2010, Ortiz-Santana et al. 2013). Outra espécie que está relacionada à *A. serialis* é *A. leucaena* Y.C. Dai & Niemelä, que se apresentou aqui de forma politômica. De acordo com dados de DNA destas espécies, suas sequências de ITS apresentam apenas 1.5% de diferença (Spirin et al. 2012). A utilização de mais marcadores moleculares ajudaria a esclarecer as relações filogenéticas nesse grupo.

Grupo *Rhodofomes* – Este clado corresponde ao gênero *Rhodofomes* Kotlába & Pouzar (pp=0.91 BS=94), espécies de *Fomitopsis rosea* (Alb. & Schwein.) P. Karst. e *Fomitopsis cajanderi* (P. Karst.) Kotl. & Pouzar, apresentam um bom valor de suporte (pp=0.91 BS=94). De acordo com a análises moleculares realizadas por Ortiz-Santana et al. (2013), o nome *Rhodofomes* deve ser resgatado e utilizado para agrupamentos que contenham essas espécies. Kotlaba & Pouzar (1998), propuseram como caracteres diagnósticos para *Rhodofomes* presença de contexto de coloração rosada e basidiósporos de parede espessa.

Os clados compostos por *Melanoporia* Murrill (pp=0.99 BS=77), *A. taxa* T.T. Chang & W.N. Chou (pp=1 BS=99), *D. ryvarideniana* Drechsler-Santos & Robledo (pp=1 BS=100), *Fomitopsis spraguei* (Berk. & M.A. Curtis) Gilb. & Ryvariden (pp=1 BS=100), *Antrodia juniperina* (Murrill) Niemelä & Ryvariden (pp=1 BS=99), apresentaram bom valor de suporte, no entanto, nossos resultados foram diferentes dos obtidos por Ortiz-Santana (2013). *Daedalea ryvarideniana*, descrita recentemente para o Brasil, não agrupou com as demais espécies de *Daedalea s.s.*, indicando a necessidade de uma nova combinação ou até a possibilidade de tratar-se de um gênero novo. Entretanto, marcadores moleculares mais conservados, como LSU, *RPB1*, *RPB2* ou *tefl* alfa, poderiam ajudar a esclarecer as relações filogenéticas destas espécies.

Grupo *Daedalea sensu stricto* – O clado *Daedalea sensu stricto* (pp=1 BS=97), compreende *D. quercina* (L.) Pers., *D. dickinsii* Yasuda e *D. neotropica* D.L. Lindner, Ryvariden & T.J. Baroni. Este gênero tem sido caracterizado por espécies que apresentam sistema hifal trimitico, hifas generativas fibuladas e um distinto catahimênio (Lindner et al. 2011). Em nossas análises este grupo apresentou bons valores de suporte,

no entanto sua relação com os gêneros *Antrodia*, *Fomitopsis* e *Piptoporus* não estão claras e necessitam de reformulações taxonômicas, como por exemplo, análise crítica dos caracteres estabelecidos como diagnósticos para cada gênero (Yu et al. 2010, Bernicchia et al. 2012, Li & Cui 2012, Ortiz-Santana et al. 2013). Uma espécie indeterminada durante a realização deste trabalho como *Daedalea* sp. (DS866), com morfologia muito similar a *D. ryvarideniana*, não se agrupou com este táxon podendo tratar-se de uma nova espécie.

Grupo *Fomitopsis sensu stricto* – O clado *Fomitopsis sensu stricto* (pp=0.99 BS=77) compreende: *F. palustris* (Berk. & M.A. Curtis) Gilb. & Ryvariden, *Fomitopsis* sp. *F. meliae*, *F. pinicola* e *Piptoporus betulinus*. Este clado apresentou bons valores de suporte, corroborando os resultados obtidos por Li et al. (2013). No entanto, existem conflitos nomenclaturais com as duas espécies descritas pelo mesmo autor no mesmo ano, *F. pinicola* e *P. betulinus*, ambas espécies são tipo dos gêneros *Fomitopsis* e *Piptoporus*, respectivamente (Ortiz-Santana et al. 2013). O posicionamento de *F. palustris* neste clado já foi observado por outros autores (Kim et al. 2007, Li et al. 2012, Han & Cui 2014). *Pilatoporus* foi proposto por Kotlaba & Pouzar em 1990, um gênero monoespecífico tipificado por *Pilatoporus palustris* e caracterizado por apresentar basidiósporos com paredes finas e a presença de hifas pseudoesqueletais. Ryvariden (1991) rejeitou essa proposta, por considerar esses caracteres insuficientes para separação dos gêneros, sinonimizando-o em *Fomitopsis*. Estudos têm demonstrado que o posicionamento desta espécie ainda necessita de mais análises e revisão morfológica (Ortiz-santana et al. 2013). Durante a realização deste trabalho, nós adicionamos sequências de *Fomitopsis* coletados na região Neotropical (Argentina e Brasil) identificadas previamente como *F. palustris* (ROBLED02035) e *F. meliae* (DS1292) ambos associados a hospedeiros exóticos. Espécies com ampla distribuição e encontradas frequentemente em hospedeiros introduzidos, tem levantado importantes questões a respeito da conservação de espécies de Fungos. Sendo assim, muitos trabalhos têm sido realizados com o intuito de verificar o centro de origem e dispersão das espécies, através de técnicas de biologia molecular e filogeografia (Liu et al. 2009, Gazis & Chaverri 2010).

O clado identificado como *Fomitopsis* spp. (pp=1 BS=100), compreende espécies de *Fomitopsis* Neotropicais: (*F. lilacino-gilva* (Beck.) Wright & Desch. e *F. cupreo-rosea* (Berk.) Carranza & Gilbn.). Este resultado foi similar ao obtido por Ortiz-Santana et al. (2013), estas espécies também foram tratadas por Carranza-Morse & Gilbertson (1986), como amplamente distribuídas em áreas temperadas e tropicais,

apresentam caracteres como: contexto cor-de-rosa, sistema hifal trimítico e basidiósporos de parede fina. Novas coletas e sequências destes materiais poderiam ajudar a elucidar o posicionamento genérico destes táxons.

Os cladogramas *Antrodia oleracea* (R.W. Davidson & Lombard) Ryvardeen (pp=1 BS=100) e *Antrodia hyalina* (pp=1 BS=100), obtiveram topologia diferente das obtidas por Ortiz-Santana et al. (2013). *Antrodia hyalina* e *A. oleracea* se posicionaram como grupos irmãos, no entanto, nossa análise não foi estatisticamente corroborada.

O clado *Antrodia ramentacea* apresentou um bom valor de suporte (pp=1 BS=99). De acordo com Spirin (2007), esta espécie deve ser excluída do gênero *Antrodia*, visto que seus caracteres macroscópicos, como basidiomas macios e himenóforo gelatinoso, são caracteres diagnósticos do gênero *Cartilosoma* Kotl. & Pouzar, e a combinação para o mesmo é sugerida pelo autor.

O Grupo *Amyloporia sordida* compreende *A. sordida* e *A. crassa* (pp=1 BS=91). Originalmente *A. sordida* Ryvardeen & Gilb. foi descrita da América do Norte. Sua principal característica morfológica é a presença de hifas esqueléticas que se dissolvem em KOH (Cui & Dai 2013). Rajchenberg et al. (2011) confirmou que as espécies de *A. sordida* da Europa apresentam um comportamento nuclear tetrapolar, enquanto que as espécies da América do Norte apresentam comportamento bipolar. Testes de cruzamentos entre as espécies da América do Norte e América do Sul são sugeridos a fim de confirmar a identidade deste táxon.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as relações filogenéticas do “*core antrodia group*” não estão resolvidas de maneira satisfatória. Uma reavaliação de caracteres como micromorfologia detalhada, distribuição geográfica e preferência de substrato, para cada gênero, são necessárias.

A confirmação molecular de espécies que originalmente foram descritas das regiões temperadas da América do Norte e Europa resgata importantes questões sobre o centro de dispersão e origem das espécies. Realizar análises com diferentes marcadores moleculares podem esclarecer importantes questões sobre processos de especiação em espécies destes gêneros. Além disso, a inclusão de materiais da região Neotropical nas filogenias já propostas para este grupo mostrou auxiliar na delimitação dos gêneros ou na proposição de novos gêneros para a ciência.

## REFERÊNCIAS

- Banik MT, Lindner DL, Ota Y, Hattori T. 2010. Relationships among North American and Japanese *Laetiporus* isolates inferred from molecular phylogenetics and single-spore incompatibility reactions. *Mycologia* 102: 911–917.
- Banik MT, Lindner DL, Ortiz-Santana B, Lodge DJ. 2012. A new species of *Laetiporus* (Basidiomycota, Polyporales) from the Caribbean basin. *Kurtziana* 37:15–21.
- Baltazar JM, Trierweiler-Pereira L, Loguercio-Leite C. 2009. A checklist of xylophilous basidiomycetes (Basidiomycota) in mangroves. *Mycotaxon* 107: 221–224.
- Bernicchia A, Gorjón SP, Vampola P, Ryvarden L, Prodi A. 2012. A phylogenetic analysis of *Antrodia s.l.* based on nrDNA ITS sequences, with emphasis on rhizomorphic European species. *Mycol Prog* 11:93–100.
- Binder M, Hibbett DS, Larsson KH, Larsson E, Langer E, Langer G. 2005. The phylogenetic distribution of resupinate forms across the major clades of mushroom-forming fungi (Homobasidiomycetes). *Syst Biodivers* 3:113–157.
- Blanco-Dios JB, Wang Z, Binder M, Hibbett DS. 2006. A new *Sparassis* species from Spain described using morphological and molecular data. *Mycol Res* 110:1227–1231.
- Carranza-Morse J, Gilbertson RL. 1986. Taxonomy of the *Fomitopsis rosea* complex (Aphyllorphales, Polyporaceae). *Mycotaxon* 25:469–486.
- Chiu HH. 2007. Phylogenetic analysis of *Antrodia* species and *Antrodia camphorata* inferred from internal transcribed spacer region. *Antonie van Leeuwenhoek* 91:267–276.
- Cui BK, Dai YC. 2013. Molecular phylogeny and morphology reveal a new species of *Amyloporia* (Basidiomycota) from China. *Antonie van Leeuwenhoek* 104:817–827.
- Dai YC, Cui BK, Yuan HS, Li BD. 2007. Pathogenic wood-decaying fungi in China. *For Path* 37:105–120.

- Dai YC, Niemelä T. 2002. Changbai wood-rotting fungi 13. *Antrodia sensu lato*. Ann Bot Fennici 39:257–265.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8) 772.
- Dentinger BTM, Margaritescu S, Moncalvo JM. 2010. Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. Molecular Ecology Resources 10: 628–633.
- Desjardin DE, Wang Z, Binder M, Hibbett DS. 2004. *Sparassis cystidiosa* sp. nov. from Thailand is described using morphological and molecular data. Mycologia 96 (5):1010-1014.
- Drechsler-Santos ER, Cavalcanti MAQ, Loguercio-Leite C, Robledo GL. 2012. On Neotropical *Daedalea* species: *Daedalea ryvaridenica* sp. nov. Kurtziana 37:65–72.
- , Groposo C, Loguercio-Leite C. 2008. Additions to the knowledge of lignocellulolytic Basidiomycetes (Fungi) in forests from Santa Catarina State, Brazil. Mycotaxon 103: 197–200.
- Gazis R, Chaverri P. 2010. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. Fungal Ecology 3:240-254.
- Garcia-Sandoval R, Wang Z, Binder M, Hibbett DS. 2011. Molecular phylogenetics of the *Gloeophyllales* and relative ages of clades of Agaricomycotina producing a brown-rot. Mycologia 103:510–524.
- Gilbertson RL. 1980. Wood-rotting fungi of North America. Mycologia 72:1–49.
- Gilbertson, R.L. & Ryvariden, L. 1986. North American polypores. Fungiflora, Oslo.
- Gibertoni TB. & Drechsler-Santos ER. 2010. Lignocellulolytic Agaricomycetes from the Brazilian Cerrado biome. Mycotaxon 111:87-90.

Guindon S, Gascuel, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.

Góes-Neto A, Loguercio-Leite C, Guerrero RT, 2005. DNA extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas* 18(2): 19-32.

Groposo C, Loguercio-Leite C. 2005. Contribution to the lignocellulolytic fungi (Basidiomycetes) of the Atlantic Rain Forest in Southern Brazil. *Mycotaxon* 92: 103-106.

Gomes-Silva AC, Gibertoni T. 2009. Revisão do Herbário URM. Novas ocorrências de Aphyllphorales para a Amazônia brasileira. *Revista Brasil. Bot* v.32. n.3: 587-596.

Han ML, Cui BK. 2014. Morphological characters and molecular data reveal a new species of *Fomitopsis* (Polyporales) from southern China. *Mycoscience* xxx: 1-9.

Hibbett, D.S. & Donogue, M.J. 2001. Analysis of character correlations among wood decay mechanism, mating systems, and substrate ranges in Homobasidiomycetes. *Systematic Biology* 50: 215-242.

Holmquist O, Cadenas A, Pietrantonio P, Maggiorani A, Bracamonte L. 2009. Notes on *Laetiporus sulphureus* s.lat. (Aphyllphorales-Basidiomycetes) in Venezuela. *Rev Forest Venez* 53:129-134.

Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT. multiple sequence alignment software 7: improvements in performance and usability. *Mol Bio Evo* 30:772-780.

Kim SY, Park SY, Jung HS. 2001. Phylogenetic classification of *Antrodia* and related genera based on ribosomal RNA internal transcribed spacer sequences. *J Microbiol Biotechnol* 11:475-481.

Kim SY, Park SY, Ko KS, Jung HS. 2003. Phylogenetic analysis of *Antrodia* and related taxa based on partial mitochondrial SSU rDNA sequences. *A van Leeuwenhoek* 83:81-88.

Kim KM, Yoon YG, Jung HS. 2005. Evaluation of the monophyly of *Fomitopsis* using parsimony and MCMC methods. *Mycologia* 97:812–822.

Kim KM, Lee JS, Jung HS. 2007. *Fomitopsis incarnatus* sp. nov. based on generic evaluation of *Fomitopsis* and *Rhodofomes*. *Mycologia* 99:833–841.

Kotlaba F, Pouzar Z. 1990. Type studies of polypores described by A. Pilát-III. *Ces. Mykol.* 44:228-237.

———. 1998. Notes on the division of the genus *Fomitopsis* (polyporales). *Folia Cryptog. Estonica*, Fasc.33:49-52.

Li HJ, Cui BK. 2013a. Two new *Daedalea* species (Polyporales, Basidiomycota) from south China. *Mycoscience* 54:62–68.

Li HJ, Han ML, Cui BK. 2013b. Two new *Fomitopsis* species from southern China based on morphological and molecular characters. *Mycol Prog* 12:709–718.

Liu M, Milgroom MG, Chaverri P, Hodge KT. 2009. Speciation of a tropical fungal species pair following transoceanic dispersal. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51:413-426.

Lindner DL, Banik MT. 2008. Molecular phylogeny of *Laetiporus* and other brown-rot polypore genera in North America. *Mycologia* 100:417–430.

Lindner DL, Ryvar den L, Baroni TJ. 2011. A new species of *Daedalea* (Basidiomycota) and a synopsis of core species in *Daedalea sensu stri*. *N Am Fungi* 6:1–12.

Ortiz-Santana B, Lindner DL, Miettinen O, Justo A, Hibbett DS. 2013. A phylogenetic overview of the antrodia clade (Basidiomycota, Polyporales). *Mycologia* 105:1391–1411.

Rajchenberg M, Gorjón SP, Pildain MB. 2011. The phylogenetic disposition of *Antrodia s.l.* (Polyporales, Basidiomycota) from Patagonia, Argentina. *Aust Syst Bot* 24:111–120.

———. 2011. Nuclear behavior of the mycelium and the phylogeny of Polypores (Basidiomycota). *Mycologia* 103 (4):677-702.

Ryvarden L. 1991. Genera of Polypores. Nomenclature and Taxonomy. Oslo, Fungiflora.

Spirin V, Miettinen O, Pennanen J, Kotiranta H, Niemelä T. 2012. *Antrodia hyalina*, a new polypore from Russia, and *A. leucaena*, new to Europe. *Mycol Prog* 12:53-61.

Spirin V, Vlasák J, Niemela T, Miettinen O. 2013. What is *Antrodia sensu stricto* (Polyporales, Basidiomycota). *Mycologia* 105(6) 1555-1576.

Spirin W. 2007. New and noteworthy *Antrodia* species (Polyporales, Basidiomycota) in Russia. *Mycotaxon* 101: 149–156.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Vaidya A, Singh T. 2012. Pre-treatment of *Pinus radiata* substrates by basidiomycetes fungi to enhance enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Lett* 34:1263–1267.

Yu ZH, Wu SH, Wang DM, Chen CT. 2010. Phylogenetic relationships of *Antrodia* species and related taxa based on analyses of nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Bot Stud* 51:53–60.

Zhou LW, Wei YL. 2012. Changbai wood-rooting fungi 16. A new species of *Fomitopsis* (Fomitopsidaceae). *Mycol Prog* 11:435–441.



Tabela I. Espécies Sequenciadas para Estudo.

<b>Espécie</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Substrato</b>
<i>Amyloporia sinuosa</i> GKF 52	Brasil, Santa Catarina (SC), Parque Nacional de São Joaquim	<i>Eucaliptus</i>
<i>Antrodia neotropica</i> GKF 44	Brasil, SC, Parque Nacional de São Joaquim	<i>Baccharis uncinella</i>
<i>A. neotropica</i> GKF 49	Brasil, SC, Parque Nacional de São Joaquim	<i>Baccharis uncinella</i>
<i>A. neotropica</i> DS1386	Brasil, SC, Parque Estadual Acaráí	Madeira morta
<i>A. malicola</i> GKF 67	Brasil, SC, Florianópolis (CCB )	Madeira morta
<i>A. malicola</i> Robledo 1311	Argentina, Salta, Dpto. Sta. Victoria Oeste, Parque Nacional Baritú, Abra de Minas (entre Lipeo y Baritú)	Madeira morta
<i>A. malicola</i> Robledo 1192	Argentina, Salta, Dpto. Sta. Victoria Oeste, Parque Nacional Baritú, Abra de Minas (entre Lipeo y Baritú)	Madeira morta
<i>A. malicola</i> Robledo 2253	Argentina, Salta, Dpto. Sta. Victoria Oeste, Parque Nacional Baritú, Abra de Minas (entre Lipeo y Baritú)	Madeira morta
<i>Daedalea ryvarдениana</i> DHCR 001	Brasil, MT, Parque Nacional de Chapada dos Guimarães	Madeira morta
<i>Daedalea ryvarдениana</i> URM80515	Brasil, CE	Madeira morta
<i>Daedalea</i> sp. DS 866	Brasil, BA, Parque Estadual Serra do Condurú	Madeira morta
<i>Fomitopsis palustris</i> Robledo 2035	Argentina, Córdoba, Ciudad Universitaria	<i>Fraxinus Excelsior</i>
<i>Fomitopsis meliae</i> DS 1292	Brasil, SC, Aurora	<i>Pinus</i>

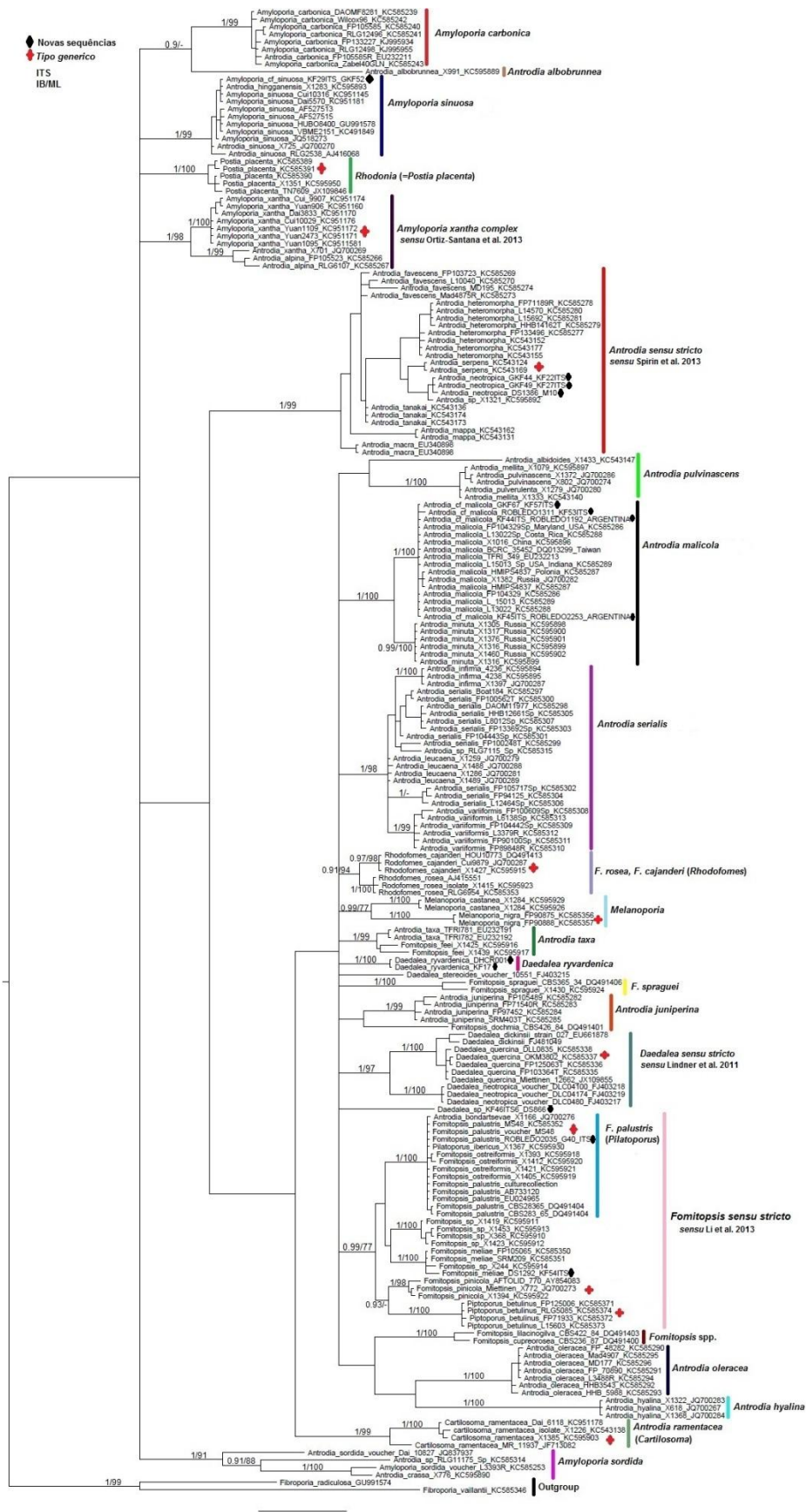


Figura 1. Árvore filogenética do “core antrodia group” gerada a partir de seqüências de ITS com análises de Inferência Bayesiana e Máxima verossimilhança. Os valores de suporte apresentados nos ramos considerados significativos IB ( $\geq 0.95$ ) e BS ( $\geq 70$ ).

**CAPÍTULO II – *Antrodia neotropica* sp. nov. (Polyporales,  
Basidiomycota): a new South American species of *Antrodia* s.s. from  
Brazil based on morphological, molecular and ecological data**

Short title: *Antrodia* sensu stricto in the Neotropical Region  
*Antrodia neotropica* sp. nov. (Polyporales, Basidiomycota): a new South  
American species of *Antrodia* s.s. from Brazil based on morphological,  
molecular and ecological data

Gesieli Kaipper-Figueiró

*Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário  
Trindade, CEP: 88040- 900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.*

Gerardo Lucio Robledo\*

*Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Universidad Nacional  
de Córdoba, C.C.495, 5000, Córdoba, Argentina.*

Mateus Arduvino Reck

*Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário  
Trindade, CEP: 88040- 900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.*

Aristóteles Góes-Neto

<sup>3</sup>*Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM), Departamento  
de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Avenida Transnordestina, Feira de Santana, CEP: 44036-900, Bahia,  
Brazil.*

Elisandro Ricardo Drechsler-Santos\*

<sup>1</sup>*Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário  
Trindade, CEP: 88040- 900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.*

**Abstract:** During the revision of the *Antrodia* species from Atlantic Forest in southern Brazil, some specimens collected on dead branches of *Baccharis* (Asteraceae) represented an undescribed species, *Antrodia neotropica* sp. nov. Morphologically, this new species is characterized by resupinate to effused-reflexed basidiomata with cream to brown pore surface, a dimitic hyphal system and basidiospores that are cylindrical to subcylindrical and then ovoid to slightly ellipsoid in frontal view, and in side-view present a sigmoid ventral side. Molecular phylogeny inferred from nrRNA ITS sequence data confirmed that this species belongs to the *Antrodia* sensu stricto clade, closely related to European and North American species, *A. serpens* and *A. heteromorpha*. Its relationships within *Antrodia* s.s. as well as biological and morphological characters of *Antrodia* s.s. are discussed

**Key words:** brown-rot, polypore, phylogeny, ITS, taxonomy.

## INTRODUCTION

*Antrodia* P. Karst. comprises in a wide sense, brown-rot polypores morphologically characterized by resupinate to pileate basidiomata, of seasonal to perennial growth habit, a dimitic hyphal system with clamped generative hyphae and hyaline, thin-walled and usually cylindrical to oblong-ellipsoid basidiospores which are negative in Melzer's reagent (Gilbertson and Ryvarden 1986, Ryvarden 1991, Ryvarden and Gilbertson 1993, Bernicchia and Ryvarden 2001, Núñez and Ryvarden 2001). However, phylogenetic works have shown that *Antrodia* is polyphyletic and several species traditionally treated as *Antrodia* are distributed throughout phylogeny in different clades closely related to other brown-rot species, such as *Amyloporia* Singer, *Daedalea* Pers. and *Fomitopsis* P. Karst, or with an uncertain position without relationships to a known genus (Kim et al. 2003, Yu et al. 2010, Rajchenberg et al. 2011a, Bernicchia et al. 2012, Spirin et al. 2012, Spirin et al. 2013, Ortiz-Santana et al. 2013). The phylogenetic position and circumscription of some of these groups/genera and species remains, so far, unclear.

A re-circumscription of *Antrodia* s.s. and the identity of its type species, *Antrodia serpens* (Fr.) P. Karst., was recently proposed based on morphological and molecular data (Spirin et al. 2013). *Antrodia* s.s. was defined as a monophyletic clade comprising the type and other five species [*A. favescens* (Schwein.) Vlasák & Spirin, *A. heteromorpha* (Fr.) Donk, *A. macra* (Sommerf.) Niemelä, *A. mappa* (Overh. & J. Lowe) Miettinen & Vlasák, *A. tanakai* (Murrill) Spirin & Miettinen] which share a combination of characters distinguishing it from other *Antrodia*

s.l. species: short-lived pedunculate basidia, hyphidia, and skeletal hyphae bending into hymenium as skeletocystidia and spore shape (fusiform distal end), as argued by Spirin et al. (2013). *Antrodia* s.s. species are morphologically quite similar with overlapping characters, and species circumscription based solely on morphology becomes more difficult. Therefore ecological characters, i.e. nutritional strategy (saprobes on dead substrates/parasites on living substrates), substrate type (branch/log/stem/etc, angiosperm/gymnosperm/etc), substrate specificity and distribution, become increasingly important.

In this new phylogenetic scenario, species of *Antrodia* s.s. are described as restricted to temperate regions of North America (*A. favescens*), Europe (*A. serpens* type) or circumglobal in the Northern hemisphere, widespread in the coniferous forests (*A. heteromorpha*) (Spirin et al. 2013). However, records of *Antrodia* s.s. species are reported from tropical and subtropical regions of the world. In South America, *A. albida* (Fr.) Donk [= *A. heteromorpha* fide Spirin et al. (2013)] has been recurrently reported from the Atlantic Rain Forest of Southern Brazil on angiosperm substrata (Meijer 2006, Drechsler-Santos et al. 2008, Reck & Silveira 2008, Leal & Gugliotta 2008, Trierveiler-Pereira et al. 2009, Baltazar & Gibertoni 2009, Motato-Vásquez & Gugliotta 2013). Macro and microscopical descriptions of these records do not evidence differences with the current circumscription of *A. heteromorpha*. On the other hand, ecological data (geographic distribution, climate and substrate type) are clearly different and contrasting. This situation confronts us to a recurrent dilemma on distribution-host specificity relationship within wood-decaying fungi: generalists and widely distributed species? ... Or host-specific species with restricted distributions (cryptic species)? It has been shown that wood-decaying fungi are not widely distributed as it was traditionally believed. Several cases in the recent literature of polypores have shown that worldwide distributed taxa represent, on the contrary, represent many distinct species, as in the case of *Fomitiporia punctata* Murrill (Decock et al. 2007, Campos-Santana et al. 2014).

In this work we present ecological, morphological and molecular evidences supporting our hypothesis that *A. albida* records from Brazil correspond to a distinct *Antrodia* species; accordingly *Antrodia neotropica* is described below as new species from Southern Brazil, the first *Antrodia* s.s. known from the Neotropical region. The inclusion of a new neotropical member in the genus, recently re-circumscribed as north temperate, leads us again to the question: what is *Antrodia* s.s.? In

addition to the phylogenetic concept, new morphological and biological evidences are added to the circumscription of the genus.

## MATERIALS AND METHODS

*Morphological studies.*—The studied specimens were deposited in the herbarium FLOR. Herbarium designations follow Thiers (2014). Colors were determined according to Munsell (1975). Basidiomata sections were examined in Melzer's reagent, cotton blue (CB) in lactic acid, cresyl blue (CBR), KOH 4%, phloxine 1% and lactophenol. All microscopic measurements ( $n = 40$ ) were made in Melzer's reagent. In presenting the size range of the microscopic elements, 5% of the measurements were excluded from each and are given in parentheses, when relevant. In the text, the following abbreviations are used for basidiospore measurements: ( $\bar{X}$  = arithmetic average) ( $Q$  = ratio length/width) ( $\bar{Q}$  = arithmetic average of  $Q$ ). To observe number of nuclei per basidiospore, a thin section of the tubes was mounted in DAPI solution following Calderoni et al. (2003) [a 0.5% (w/v) solution of DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) in distilled water was mixed at a ratio of 4:6 with McIlvaine buffer of pH 7 (1:1 mixture of 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 0.1 M citric acid) and observed with fluorescence microscope.

*DNA extraction and sequencing.*—For extraction of total genomic DNA from dried basidiomata protocol of Doyle & Doyle (1987) adapted by Góes-Neto et al. (2005) was used. The primer pairs ITS6-R and ITS8-F was used in the polymerase chain reaction to amplify the ITS (ITS1-5.8S-ITS2) region, according to the cycle parameters described in Dentinger et al. (2010). Sequencing was performed with BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit following manufacturer procedures, using the same primers cited, performed at Centro de Pesquisas René Rachou Fiocruz (Brazil) as part of the FungiBrBol ([www.brbo.org](http://www.brbo.org)). Sequences were manually checked and edited with the software Geneious 6.1.X (Biomatters).

*Phylogenetic analyses.*— A total of 44 specimens representing seven species (including outgroup), both newly generated in this study or downloaded from Genbank, were used to build an ITS dataset (TABLE I). The automatic alignment of this dataset was performed with the software MAFFT (Katoh and Standley 2013), following the F-INS-i criteria, and then manually inspected and adjusted as necessary with the software MEGA 6 (Tamura et al. 2013). Moreover, potential ambiguously regions were identified with GBLOK 0.91b (Castresana

2000) at the phylogeny.fr platform (Dereeper et al. 2008), allowing all parameters for a less stringent selection (allow smaller final blocks, allow gap positions within the final blocks, allow less strict flanking positions). The final alignment was deposited at TreeBASE (<http://www.treebase.org/treebase/index.html>). Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) searches were applied to the dataset. The best fit model of nucleotide evolution to dataset, as well the estimated base frequencies, transition/transversion ratio (*tratio*), gamma shape parameter and proportion of invariant sites, were obtained according to BIC (Bayesian Information Criterion), as implemented in the software jModelTest 2.1.4 (Guindon & Gascuel 2003, Darriba et al. 2012). Maximum Likelihood (ML) searches were carried out in the software PhyML 3.0, available in the phylogeny.fr platform, under a HKY85 model, with four gamma categories to account for the rate heterogeneity across the sites, with no proportion of invariant sites. The gamma shape used was 0.2940, and *tratio* = 2.1421; 500 bootstrap pseudoreplications (BS) were used to assess the reliability of internal branches. The BI was performed in the software Mr Bayes 3.1.2, as implemented on the CIPRES (cyberinfrastructure for phylogenetic research) Science Gateway 3.1 (Miller et al. 2010 <http://www.phylo.org/>), under a HKY model with four gamma categories, with no proportion of invariant sites. Gamma shape and ratio values were the same used in ML. Bayesian analysis were implemented with two independent runs, each one with four simultaneous independent chains for 10000000 ( $10^6$ ) generations, starting from random trees, and keeping one tree every 1000<sup>th</sup> generation. All trees sampled after convergence (average standard deviation of split frequencies <0.01 and confirmed using Tracer 1.5, Rambaut and Drummond 2007), were used to reconstruct a 50% majority-rule consensus tree (BC) and to estimate Bayesian posterior probabilities (BPP). The fraction of the sampled values discarded as burnin was 0.25. A node was considered to be well supported if it showed a BPP  $\geq$  0.9 and/or BS  $\geq$  70%. *Fomitopsis ostreiformis* (Berk.) T. Hatt. was defined as outgroup, based on previous papers that showed it as a sister group of *Antrodia* s.s (Spirin et al. 2012).

## RESULTS

*Molecular phylogeny.*—Nine new sequences were generated during this study. The ITS dataset included sequences from 44 specimens that represent seven taxa, and a total of 620 bps length (including gaps), of which 467 were constant, 150 variable informative and 83 parsimony



informative. The model of nucleotide evolution selected was HKY+G, and the estimated base frequencies are: freqA = 0.2478, freqC = 0.2154, freqG = 0.2194, freqT = 0.3175. Ten of the internal branches (ingroup) in BI and six in ML appear with significant support values. Only the topology from BI analysis is presented, while both BS and BPP values are showed in the nodes (FIG. 1).

The *Antrodia* s.s. clade, as previously recognized by Spirin et al. (2013), is well supported in both analysis (pp = 1 and BS = 100), as showed in FIG. 1. Within *Antrodia* s.s., two well supported clades can be identified: one composed by *A. tanakai*, *A. favescens*, *A. macra* and *A. mappa* (pp = 0.94 and BS = 74) and other by *A. heteromorpha*, *A. serpens* and the new *Antrodia* species. In relation to the species that make part of the first clade, our topologies show *A. macra* and *A. mappa* are more related (with low support values, i.e. pp = 0.71 and BS = 48) and as a sister group of *A. favescens/A. tanakai*, which received a significant support values (pp = 0.93 and BS = 75). In the second clade, the nine specimens of the new *Antrodia* species group together in a well-supported clade (pp = 1 and BS = 100), as well as the other two species, *A. serpens* (pp = 1 and BS = 100) and *A. heteromorpha* (pp = 1 and BS = 99). The new *Antrodia* species and *A. serpens* seem to be more related, but the support values are not significant (pp = 0.8 and BS = 68).

## TAXONOMY

***Antrodia neotropica*** Kaipper-Figueiró, Robledo & Drechsler-Santos, **sp. nov.** FIGS. 2–3

MycoBank MB809618

*Typification*: BRAZIL, SANTA CATARINA, Parque Nacional de São Joaquim, on dead tree of *Baccharis uncinella* DC., 21 oct 2013, *G. Kaipper-Figueiró* 44 (**holotype** FLOR0054184).

*Etymology*: *neotropica*, referring to the neotropical distribution of the species, so far known only from Southern Brazil.

Basidiomata seasonal, resupinate to rarely effuse-reflexed, clustered in several regular and adjacent spots on wood, not easily separated from substratum, up to 20 cm long, 4 cm wide and 2.5 mm thick, with a soft leathery consistency when fresh, leathery to corky upon dried; *margin* up to 0.5–2.0 mm wide, narrow, whitish, regular, fimbriate to cottony, sterile, present in both young and old basidiomata. Pore surface whitish (when primordial), cream to brownish when mature (HUE 10 YR, 6/6), buff upon dried. Pores 1–2/mm (10–16/cm), round to angular, at first regular and with entire thick dissepiments (FIG 2C),

then irregular, elongated to lacerated, sinuous to straight, with thin dissepiments, mainly when the basidiomata is vertically oriented located on vertical substrata (FIG. 2E). Subiculum up to 0.5 mm thick, white to cream colored; tubes concolorous with pore surface, up to 2.0 mm thick.

Hyphal system dimitic in the subiculum and trama of the tubes. Generative hyphae with clams, hyaline and thin walled to slightly thick-walled and then yellowish to slightly greenish yellow in KOH, sinuous, 2.5–3.0  $\mu\text{m}$  wide, dominant in the basal layer against the substrate (FIG. 3B); skeletal hyphae unbranched, straight to slightly sinuous and geniculated at the base, then occasionally with lateral aborted processes, loose interwoven in the subiculum, dominant through trama of the tubes where they are more or less parallel arranged (FIG. 3B), 2.5–4.0  $\mu\text{m}$  wide, evenly thick-walled with walls up to 2.0  $\mu\text{m}$  with a capilar lumen (almost solid), hyaline, yellowish to slightly greenish yellow in KOH, isodiametric and slightly widening at the apex (often collapsed) where walls are thin and 2–3 adventitious septa are present, metachromatic staining dark violaceous blue in CRB, IKI-, CB-. Basidia clavate, 35–50  $\times$  8.5–10  $\mu\text{m}$ , with four sterigmata, basidioles similar to slightly smaller than basidia, hyphidia present 35–50  $\times$  2–3  $\mu\text{m}$ , straight or with 2–3 small branches at the apex. Basidiospores in frontal view cylindrical to subcylindrical and then ovoid to slightly ellipsoid (7.0–)8.0–14.0(–15.0)  $\times$  (4.0–)4.0–5.0(–6.0)  $\mu\text{m}$ , ( $\bar{X}$  = 10.48  $\times$  4.41  $\mu\text{m}$ ),  $Q$  = 1.92–2.74  $\mu\text{m}$ , ( $\bar{Q}$  = 2.40  $\mu\text{m}$ ), in side-view with a sigmoid ventral side, i.e. distinctly concavous supra-apicular depression and a tapering apex (FIG. 3A, see Discussion), thin-walled fairly distinct, hyaline, IKI-, CB-, binucleate. *Ecology and Distribution*: so far restricted to the Atlantic Forest domain of Santa Catarina and Rio Grande do Sul states in Southern Brazil, always in grasslands with sparse shrubs (locally known as "campos sujos"), in a mosaic of distinct phytophysiognomies, near Araucaria forest and between 500 and 1000 m.a.s.l. Most specimens were collected on dead branches of *B. uncinella*, it is the case for all specimens from Santa Catarina state, while two collections from Rio Grande do Sul state had the substrata determined only as *Baccharis* sp. The species causes a brown-rot, easily evidenciabile on the substrate (FIG. 2B).

*Specimens examined*.— BRAZIL, SANTA CATARINA, Parque Nacional de São Joaquim, on dead fallen branches of *B. uncinella*. 21 Oct 2013, *G. Kaipper-Figueiró* KF043 (FLOR0054183); 21 Oct 2013, *G. Kaipper-Figueiró* KF044 (FLOR0054184); 21 Oct 2013, *G. Kaipper-Figueiró* KF045 (FLOR0054185); 21 Oct 2013, *G. Kaipper-Figueiró* KF046 (FLOR0054186); 21 Oct 2013, *G. Kaipper-Figueiró* KF047

(FLOR0054187); 21 Oct 2013, *G. Kaipper-Figueiró* 48 (FLOR0054188); 21 Oct 2013, *G. Kaipper-Figueiró* KF049 (FLOR0054189); 21 Oct 2013, *G. Kaipper-Figueiró* KF050 (FLOR0054190); 21 Oct 2013, *G. Kaipper-Figueiró* 53 (FLOR0054191); 21 Oct 2013, *G. Kaipper-Figueiró* KF054 (FLOR0054192) 16 Feb 2013, *ER Drechsler-Santos* DS0950 (FLOR0054195); 16 Feb 2013, *ER Drechsler-Santos* DS0952 (FLOR0054192); 17 Feb 2013, *ER Drechsler-Santos* DS0961 (FLOR00197); 17 Feb 2013, *ER Drechsler-Santos* DS0963 (FLOR0054198); 17 Feb 2013, *ER Drechsler-Santos* DS0966 (FLOR0054199); 12 Jul 2013, *ER Drechsler-Santos* DS1098 (FLOR0054200); 12 Jul 2013, *ER Drechsler-Santos* DS1100 (FLOR0054201); 13 Jul 2013, *ER Drechsler-Santos* DS1101 (FLOR0054202); 13 Jul 2013, *ER Drechsler-Santos* DS1103 (FLOR 0054203); 13 Jul 2013, *ER Drechsler-Santos* DS1105 (FLOR0054204); 13 Jul 2013, *ER Drechsler-Santos* DS1107 (FLOR0054205); 13 Jul 2013, *ER Drechsler-Santos* DS1109 (FLOR0054206); 14 Sep 2013, *ER Drechsler-Santos* DS1117 (FLOR0054207); 14 Sep 2013, *ER Drechsler-Santos* DS1118 (FLOR0054208); 14 Sep 2013, *ER Drechsler-Santos* DS1119 (FLOR0054209); RIO GRANDE DO SUL: São Francisco de Paula, PROMATA-PUC, on dead fallen branches of *Baccharis* sp. 17 Apr 2013, *A. Casale Magnago* 628a (FLOR0054193); 17 Apr 2013, *A. Casale Magnago* 628b (FLOR0054194).

## DISCUSSION

*Antrodia neotropica* within *Antrodia sensu stricto*.— *Antrodia neotropica* is characterized by its seasonal basidiomata, mostly resupinate to effused-reflexed, with a cream to yellowish brown pore surface, a dimitic hyphal system with clamped generative hyphae, and basidiospores that are cylindrical to subcylindrical and then ovoid to slightly ellipsoid in frontal view, and with a sigmoid ventral side in side-view (i.e. distinctly concavous supra-apicular depression and a tapering apex). These micromorphological features placed *A. neotropica* into *Antrodia sensu stricto* (s.s.) *sensu* Spirin et al. (2013). Phylogenetic analysis (BI and ML) showed *A. neotropica* forming a well distinct, strongly supported, clade. Within *Antrodia* s.s., *A. neotropica* groups with two morphologically closely related species, i.e. *A. serpens* and *A. heteromorpha*, in well supported clade, hereafter called *Antrodia heteromorpha* complex.

Species of the *Antrodia* s.s. species have a more or less general similar macro and micromorphology and the distinction of these taxa is

a difficult task, mainly because of the overlapping of characters (Kim et al. 2003, Bernicchia et al. 2012, Spirin et al. 2012, 2013, Cui 2013, Chiu 2007, Yu et al. 2010). However they present different geographical distributions (Ortiz-Santana et al. 2013, Spirin et al. 2013). Therefore, the integration of molecular and ecological characters (type of host and geographic distribution) become important to delimitate species.

Even though *A. neotropica* seems to have slightly bigger basidiospores, basidiospores size overlaps within *A. heteromorpha* complex (TABLE II, FIG. 4). However, there are some others morphological differences that can be observed that in addition to host and geographic distribution allow its distinction. *Antrodia serpens* differs from *A. neotropica* due their grayish to pale ochraceous pore surface (whitish when primordial, cream to brownish when mature in *A. neotropica*) (Spirin et al. 2013). Furthermore, *A. serpens* is described as restricted to southern Europe, usually collected on different species of angiosperms (Spirin et al. 2013). *Antrodia heteromorpha* has similar basidiomata to those of *A. neotropica*, but it usually grows on coniferous hosts in North America and Eurasia (Spirin et al. 2013).

Regarding other species of *Antrodia* s.s., *A. favescens* and *A. tanakai* differ macro and microscopically from *A. neotropica*. Macroscopically, they present small pilei growing individually, and the color of pore surface is often ochraceous. Microscopically, both species have irregular crystals on hymenium, encrusted basidia and smaller basidiospores (FIG. 4). Our molecular data reveal that *A. favescens* is closely related to *A. tanakai*, as has been previously shown (Spirin et al. 2013), and are distributed in distinct geographic areas in the North Hemisphere, North America and Eurasia respectively. *Antrodia macra* differs from *A. neotropica* mainly by their distinctively smaller pores 2-3/mm (Niemelä 1985, Ryvarden & Melo 2014, Spirin et al. 2013) and narrower basidiospores (TABLE II, FIG. 4). In addition *A. macra* is distributed through Europe where grows exclusively on *Salix* L. and *Populus tremula* L., but also has been reported from Siberia and China (Ryvarden & Melo 2014). *Antrodia mappa* present morphological differences that separates from all other species in the genus. Their basidiomata are extremely thin and readily separable, with a fimbriate margin and pores 3-4/mm. Microscopically present a monomitic hyphal, although skeletal hyphae can be found in the subiculum of old basidiomata (Niemelä 1985). So far the species is know from Scandinavia and Italy growing on dead conifer wood (Ryvarden & Melo 2014).

The inclusion of *A. neotropica*, the first tropical member, in the phylogeny of *Antrodia* s.s. contributed to a better understanding of the species relationships than previously known (Ortiz-Santana et al. 2013, Spirin et al. 2013). Our results show that two main clades can be recognized. One clade, i.e. *Antrodia heteromorpha* complex, constituted by *A. serpens*, *A. heteromorpha* and *A. neotropica*. Basidiospore morphology in this clade is mostly identical. *Antrodia serpens* and *A. neotropica* grow, so far, exclusively on deciduous wood, whereas *A. heteromorpha* on both deciduous and conifer wood. The second clade is constituted by *A. favescens*, *A. tanakai*, *A. macra* and *A. mappa*.

*Biological and morphological characters of Antrodia sensu stricto.*

Biological characters, i.e. type of rot, nuclear behavior and mating system, besides morphological characters, have been proven to be homogeneous within genera of polypores and, consequently, a strong feature to characterize and distinguish them. Additionally, the combination of these characters allows distinguishing genera closely related, corroborating clades recovered by phylogenetic studies, such as those of Rajchenberg (2011b) and James et al. (2013).

*Antrodia* s.l. presents particular biological characters, i.e. normal nuclear behavior with uni or binucleate basidiospores that display homothallism or bipolarity in mating systems (Rajchenberg 2011b). So far, all species with two nuclei per basidiospore e.g. *A. heteromorpha* (as *A. albida*), and *A. macra* (as *A. salicina* (Bres.) Niemelä) (Rajchenberg 2011b) belong to *Antrodia* s.s. Our results showed that *A. neotropica* present two nuclei per basidiospore (FIG. 2H), suggesting that this is a character for *Antrodia* s.s. On the other hand, uninucleate *Antrodia* species (*A. albidoides* A. David & Dequatre, *A. subalbidoides* A. David & Dequatre, *A. malicola* (Berk. & M.A. Curtis) Donk, *A. ramentacea* (Berk. & Broome) Donk, *A. serialis* (Fr.) Donk, *A. sinuosa* (Fr.) P. Karst, *A. submalicola* A. David & Dequatre, *A. subramentacea* A. David & Dequatre, *A. variiformis* (Peck) Donk, (Rajchenberg 2011b) are distributed in different brown-rot genera of the ‘core antrodia clade’ (Ortiz-Santana et al. 2013, Spirin et al. 2013).

*Hyphal system structure.*—Hyphal system structure arouses as an important generic diagnostic character, mainly for taxonomically complex genera. Besides the characterization of the hyphal system as dimitic, a detailed morphological analysis, in order to determine the kind of skeletal hyphae, size (length from the septum), branching patterns and distribution throughout basidiome is important to define *Antrodia* s.s. Detailed analysis of hyphal system in *Perenniporia* s.l. Murrill was very

important and helpfully to determine genera and species (e.g. *Perenniporiella* Decock & Ryvarden, *Perenniporia* s.s. based on *Perenniporia medulla-panis* (Jacq.) Donk s.s.), which were corroborated latter by molecular studies (Decock & Ryvarden 2003, Decock & Stalpers 2006, Robledo et al. 2009).

The presence of skeletal hyphae that penetrate into hymenium has been reported to be present in several genera of brown-rot polypores as *Daedalea*, *Fomitopsis* and *Ryvardenia* Rajchenb. (Rajchenberg 2006). Specifically, it is a typical feature for *Daedalea*, in which these kind of hyphae are dominating and a distinct cathymenium can be observed (e.g. *D. aethalodes* (Mont.) Rajchenb., *D. quercina* (L.) Pers., *D. neotropica* D.L. Lindner, Ryvarden & T.J. Baroni and *D. ryvardenica* Drechsler-Santos & Robledo (Rajchenberg 1985, Lindner et al. 2011, Drechsler-Santos et al. 2012). The use of the term “skeletocystidia” for these kind of hyphae in *Antrodia* s.s. should be avoided. The concept of skeletocystidia refers to deuteromplasmatic pseudocystidia, i.e. penetration of the hymenium by a differentiated hypha, as in *Stereum* Hill ex Pers. species (Clémenton 2012). Skeletal hyphae in *A. neotropica* are loose interwoven in the subiculum and more or less parallel arranged in the trama of the tubes. This pattern of arrangement of skeletal hyphae trough basidioma also has been observed in *Antrodia* s.s. as in *A. favescens* and *A. tanakai* (Spirin et al. 2013). However the closest relatives of *A. neotropica*, i.e. *A. heteromorpha* and *A. serpens*, present skeletal hyphae parallel arranged in the context (Spirin et al. 2013).

In addition to the skeletal hyphae, the characteristics of the walls of generative hyphae are also taxonomic important in brown-rot polypores. It has been suggested that irregular wall thickness is a specific character present in brown-rot polypores, so far not observed in white-rot polypores (Rajchenberg 1985). The presence of irregular wall thickness have been described in *Antrodia* s.l., *Postia* Fr., *Oligoporus* Bref. and *Daedalea* (Rajchenberg 2006, Drechsler-Santos et al. 2012). This kind of generative hyphae are present in both basidiomata and, typically, in culture. Sometimes these irregular thick-walled generative hyphae are restricted to the basal parts of the basidioma, mainly in the context areas closest to the substrate or inside the wood (Rajchenberg pers. com., GR pers. observations). Strikingly, this character has not been observed in *Antrodia* s.s. So far, generative hyphae are thin to evenly slightly thick-walled.

*Basidia and basidiospores morphology.*—*Antrodia neotropica* shows large clavate basidia (35–50 × 8.5–10 µm). This particular large size of

basidia is characteristic of the genus and have been reported for the other species (i.e.  $27\text{--}36 \times 6\text{--}8.5 \mu\text{m}$  in *A. heteromorpha*,  $29\text{--}38 \times 7\text{--}9.5 \mu\text{m}$  in *A. serpens*). Basidiospore morphology seems to show a pattern for the genus, the suprahyalar concavity in combination with the tapering apex on the basidial axis observed in lateral view is a typical character. This ventral side is defined here as sigmoid, that is related to the greek letter sigma, in particular to its double curve shape (FIG. 3A). From the dorsi-ventral view, basidiospores are mostly fusoid because of the tapering apices, subcylindrical to cylindrical (with the thicker part in the middle) to ovoid (with the thicker part displaced to the distal apex). Unfortunately the dorsi-ventral view is not described for other species of *Antrodia* s.s. and the description are terms as ellipsoid. Basidiospores of *Antrodia* s.s. species are mostly thin-walled, in *A. neotropica* they could be fairly distinct walled. Detailed observation and characterization of basidiospores morphology, i.e. shapes from distinct points of view as described by Dominguez de Toledo (1994), should be taken in account as they have been very informative for the taxonomy of other groups of basidiomycetes (Villegas et al. 2005).

Comments on *Antrodia albida* from Brazil.— *Antrodia albida* has been recorded frequently for southeast of Brazil occurring in different ecosystems (Loguercio-Leite & Wright 1991, Meijer 2006, Drechsler-Santos et al. 2008, Leal & Gugliotta 2008, Reck & Silveira 2008, Baltazar & Gibertoni 2009, Trierweiler-Pereira et al. 2009, Motato-Vásquez & Gugliotta 2013). This taxon has been characterized by having resupinate basidiomata, angular to elongated pores (1–3/mm), dimitic hyphal system and cylindrical ( $12.5\text{--}15 \times 3.75\text{--}6.25 \mu\text{m}$ ), hyaline, thin-walled and smooth basidiospores (Leal & Gugliotta 2008). Without more detailed morphological and ecological data, besides molecular evidence, this weak morphological concept lead us to keep the record as *A. heteromorpha* complex species as defined here (*A. heteromorpha*, *A. serpens* and *A. neotropica*). As has been shown by our results, geographical distribution and hosts specificity are characters of importance. *Antrodia albida* records on *Baccharis* spp. probably correspond to *A. neotropica*, whereas records from *Pinus* L. plantations and records from other substrates have to be checked in order to establish an accurate identification.

Key to *Antrodia* sensu stricto species

1. Hyphal system monomitic, skeletal hyphae present in the subiculum of old specimens.....*A. mappa*
- 1'. Hyphal system dimitic throughout all basidiomata.....2



2. Pores 2–4/mm.....*A. macra*  
 2'. Pores larger, 0.5–2/mm.....3  
 3. Basidiospores 6.5–10 µm large.....4  
 3'. Basidiospores 8–13 µm large.....(*Antrodia heteromorpha* complex) 5  
 4. Basidiomata white to pale cream when fresh, Eurasian  
 distribution.....*A. tanakai*  
 4'. Basidiomata darker (ochraceous or brownish) when fresh. North  
 American distribution.....*A. favescens*  
 5. On dead branches of *Baccharis* sp. (Asteraceae), South  
 Hemisphere.....*A. neotropica*  
 5'. On other substrates, North Hemisphere.....6  
 6. On gymnosperms.....*A. heteromorpha*  
 6'. On angiosperms.....*A. serpens*

#### ACKNOWLEDGMENTS

D.H. Costa-Rezende, V. Ferreira-Lopes, C.A. Salvador-Montoya and A.C. Magnago for their support in the field expeditions. Dr. G. Grilli and N. Gomez Montoya help improving the text and figures. *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for providing master's scholarship to GKF. The project BrBol and PPGFAP/UFSC by providing subsidies necessary for this work.

#### LITERATURE CITED

- Bernicchia A, Ryvarden L. 2001. A new *Antrodia* species (Coriolaceae, Basidiomycetes). *Mycotaxon* 79:57–66.
- , Gorjón SP, Vampola P, Ryvarden L, Prodi A. 2012. A phylogenetic analysis of *Antrodia* s.l. based on nrDNA ITS sequences, with emphasis on rhizomorphic European species. *Mycol Prog* 11:93–100.
- Baltazar JM, Gibertoni T. 2009. A checklist of the aphylloroid fungi (Basidiomycota) recorded from the Brazilian Atlantic Forest. *Mycotaxon* 109:439–442.
- Calderoni M, Sieber TN, Holdenrieder O. 2003. *Stereum sanguinolentum*: Is it an amphithallic basidiomycete? *Mycologia* 95:232–238.
- Campos-Santana M, Amalfi M, Robledo G, Silveira RMB, Decock C. 2014. *Fomitiporia neotropica*, a new species from South America



evidenced by multilocus phylogenetic analyses. *Mycol Prog*. doi: 10.1007/s11557-013-0943-1.

Chiu H. 2007. Phylogenetic analysis of *Antrodia* species and *Antrodia camphorata* inferred from internal transcribed spacer region. *Antonie van Leeuwenhoek* 91:267–276.

Cléménçon, H. 2012. Cytology and plectology of the Hymenomycetes. *J. Cramer*. 520 p.

Cui BK. 2013. *Antrodia tropica* sp. nov. from southern China inferred from morphological characters and molecular data. *Mycol Prog* 12:223–230.

Castresana J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17:540–552.

Decock C, Ryvarden L. 2003. *Perenniporiella* gen. nov. segregated from *Perenniporia*, including a key to neotropical *Perenniporia* species with pileate basidiomes. *Mycol Res* 107:93–103.

———, Stalpers JA. 2006. (1708) Proposal to conserve the name *Perenniporia* against *Physisporus* with a conserved type (Basidiomycota). *Taxon* 55:227–238.

———, Herrera Figueroa S, Robledo G, Castillo G. 2007. *Fomitiporia punctata* (Basidiomycota, Hymenochaetales) and its presumed taxonomic synonyms in America: taxonomy and phylogeny of some species from tropical/subtropical areas. *Mycologia* 99:733–752.

Drechsler-Santos ER, Groposo C, Loguercio-Leite C. 2008. Additions to the knowledge of lignocellulolytic Basidiomycetes (Fungi) in forests from Santa Catarina State, Southern Brazil. *Mycotaxon* 103:197–200.

———, Cavalcanti MA, Loguercio-Leite C, Robledo G. 2012. On Neotropical *Daedalea* species: *Daedalea ryvardenica* sp. nov. *Kurtziana* 37:65–72.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9:8, 772.

Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res*:1–36.

Dentinger BTM, Margaritescu S, Moncalvo JM. 2010. Rapid and reliable high throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. *Mol Ecol Res* 10:628–633.

Domínguez de Toledo LS. 1994. Suggestions for describing and illustrating fungal spores. *Mycotaxon* 52:259–270

Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11–15.

Góes-Neto A, Loguercio-Leite C, Guerrero RT, 2005. DNA extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas* 18:19–32.

Gilbertson RL, Ryvarde L. 1986. North American polypores. Vol. 1. *Abortiporus-Lindtneria*. Oslo, Norway. *Fungiflora* 433 p.

Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52:696–704.

James TY, Sun S, Li W, Heitman J, Kuo HC, Lee YH, Asiegbu FO, Olson A. 2013. Polyporales genomes reveal the genetic architecture underlying tetrapolar and bipolar mating systems. *Mycologia* doi:10.3852/13-162

Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT. multiple sequence alignment software 7: improvements in performance and usability. *Mol Bio Evol* 30:772–780.

Kim SY, Jung HS, Ko KS, Jung HS. 2003. Phylogenetic analysis of *Antrodia* and related taxa based on partial mitochondrial SSU rDNA sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 83:81–88.

Leal GR, Gugliotta AM. 2008. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Fungos*, 9: Meripilaceae. *Hoehnea* 35:99–110.

Lindner DL, Ryvarden L, Baroni TJ. 2011. A new species of *Daedalea* (Basidiomycota) and a synopsis of core species in *Daedalea* sensu stricto. *North American Fungi* 6:1–12.

Loguercio-Leite C, Wright JE. 1991. Contribution to a biogeographical study of the Austro-American xylophilous polypores (Aphylophorales) from the Santa Catarina Island, SC., Brazil. *Mycotaxon* 41:161–166.

Meijer AAR de. 2006. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian state of Paraná. *Bol. Mus. Bot. Munic.* 68:1–55.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. 14 Nov 2010, New Orleans, Louisiana p 1–8.

Motato-Vásquez V, Gugliotta AM. 2013. Polypores from an Atlantic rainforest area in southeast Brazil: resupinate species. *Braz. J. Bot* doi 10.1007/s40415-013-0031-4.

Munsell. 1975. *Soil Colors Charts*. Baltimore, Maryland: Munsell Color.

Núñez M, Ryvarden L. 2001. East Asian polypores 2. *Syn Fung* 14:170–522.

Niemelä, T. 1985. On Fennoscandian polypors 9. *Gelatoporia* n. gen. and *Tyromyces canadensis*, plus notes on *Skeletocutis* and *Antrodia*. *Karstenia* 25:21–40.

Overholts LO, Lowe JL. 1946. New species of *Poria*. *Mycologia* 38:202–212.

Ortiz-Santana B, Lindner DL, Miettinen O, Justo A, Hibbett DS. 2013. A phylogenetic overview of the antrodia clade (Basidiomycota, Polyporales). *Mycologia* 105:1391–1411.

Rajchenberg M. 1985. On *Trametes aethalodes* and other species of *Daedalea* (Polyporaceae). *Canadian Journal of Botany* 64:2130–2135.

———. 2006. Polypores (Basidiomycetes) from the Patagonian Andes Forests of Argentina. *Biblio Mycol Band* 201. Verlag, Germany: J. Cramer. 300 p.

———. 2011b. Nuclear behavior of the mycelium and the phylogeny of Polypores (Basidiomycota). *Mycologia* 103:677–702.

———, Gorjón SP, Pildain MB. 2011a. The phylogenetic disposition of *Antrodia* s.l. (Polyporales, Basidiomycota) from Patagonia, Argentina. *Aust Syst Bot* 24:111–120.

Rambaut A, Drummond AJ. 2007. Tracer 1.4. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>

Ryvarden L. 1991. Genera of Polypores, nomenclature and taxonomy. *Syn Fung* 5:1–363.

———, Gilbertson RL. 1993. European polypores part 1. *Syn Fung* 6:1–387.

———, Melo I. 2014. Poroid fungi of Europe. *Syn Fung* 31:1–455.

Reck MA, Silveira RMB. 2008. Polyporales (Basidiomycota) no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul. *Rev Bras de Bio* 6:301–314.

Robledo G, Amalfi M, Castillo G, Rajchenberg M, Decock C. 2009. *Perenniporiella chaquenia* sp. nov. and further notes on *Perenniporiella* and its relationships with *Perenniporia* (Poriales, Basidiomycota). *Mycologia* 101:657–673.

Spirin V, Miettinen O, Pennanen J, Kotiranta H, Niemela T. 2012. *Antrodia hyalina*, a new polypore from Russia, and *A. leucaena*, new to Europe. *Mycol Prog* 12:53–61.

———, Vlasák J, Niemela T, Miettinen O. 2013. What is *Antrodia* sensu stricto Mycologia 105:1555–1576.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis. Mol Biol Evol 30:2725–2729.

Thiers M. 2014. Index herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff.  
(<http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>, continuously updated)

Trierveiler-Pereira L, Baltazar JM, Loguercio-Leite C. 2009. Santa Catarina Island mangroves 4 xylophilous basidiomycetes. Mycotaxon 109:107–110.

Villegas M, Cifuentes J, Torres AE. 2005. Sporal characters in Gomphales and their significance for phylogenetics. Fungal Divers 18:157–175.

Yu ZH, Wu SH, Wang DM, Chen CT. 2010. Phylogenetic relationships of *Antrodia* species and related taxa based on analyses of nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. Bot Stud 51:53–60.

## LEGENDS

FIG. 1. Phylogram of *Antrodia* s.s. clade” generated from ITS sequence data with Maximum likelihood and Bayesian analysis. Support values along branches are Bayesian posterior probability ( $\geq 0.95$ ) and Maximum likelihood ( $\geq 70$ ). Two-letter codes after species names denote country of origin (ISO 3166).

FIG. 2. *Antrodia neotropica*. A-E. Macroscopic features *in situ*. A. Typical habitat and host/substrate (*Baccharis uncinella*); B. General view of basidiomata and aspect of brown-rot caused on wood (white arrow) (DS1103, FLOR 0054203); C. Young resupinate and whitish basidiome with round pores (GKF053, FLOR 0054191); D. Mature, resupinate and pale brownish basidiome with elongate and lacerate pores (GKF 049, FLOR 0054189); E. Resupinate to effused-reflexed basidiome and aspect of brown-rot caused on wood (white arrow) (DS1098, FLOR 0054200). B-E scale bars = 1 cm. F-H. Microscopic features, scale bars = 10  $\mu\text{m}$ . F. Basidium, basidiole with clamp at the base and skeletal hyphae apex (white arrows) (GKF 053, FLOR 0054191); G. Basidiospores in light microscope showing apiculous and supra-apicular depression (white arrows) (DS1107, FLOR 0054205); H. binucleate basidiospore in fluorescence microscope (holotype).

FIG. 3. Microscopic features of *Antrodia neotropica*. **Holotype**. *G. Kaipper-Figueiró* 44 (FLOR). A. Basidiospores. B. Schematic section through basidiome showing a basal layer dominated by generative hyphae arranged more or less parallel, an intermediate layer of interwoven skeletal hyphae, and finally the trama dominated by skeletal hyphae parallel arranged. C. Skeletal hyphae.

FIG. 4. Comparison of basidiospores size average of specimens and species of *Antrodia* s.s. (see also TABLE II). ● = *A. neotropica* (An), ■ = *A. heteromorpha* (Ah), ▲ = *A. serpens* (As), ● = *A. mappa* (Am), ★ = *A. macra* (Am), — = *A. favescens* (Af), ◆ = *A. tanakai* (At). Larger symbols represent the arithmetic means of the individuals average. Error bars around larger symbols correspond to Standard Deviation. Shadowed area indicates *A. heteromorpha* complex.

TABLE I. List of species, collections, and sequences used in the phylogenetic analyses. Two-letter codes after species names denote country of origin (ISO 3166).

Species/specimen	Locality	Host tree	ITS
<b><i>Antrodia favescens</i></b>			
<i>Antrodia favescens</i> Vlasák Jr 0112/2J (JV)	US	<i>Pinus</i>	KC543125
<i>Antrodia favescens</i>			DQ491414
<b><i>Antrodia tanakai</i></b>			
<i>Antrodia tanakai</i> Spirin 3968 (H)	RU	<i>Quercus mongolica</i>	KC543174
<i>Antrodia tanakai</i> Wei 1185 (H)	CN	<i>Fraxinus</i>	KC543173
<i>Antrodia tanakai</i> Ryvarden 7161 (O)	NO	<i>Salix</i>	KC543160
<i>Antrodia tanakai</i> Spirin 3532 (H)	RU	<i>Betula pubescens</i>	KC543164
<b><i>Antrodia macra</i></b>			
<i>Antrodia macra</i> CZ	CZ	<i>Salix fragilis</i>	EU340898
<i>Antrodia macra</i>			KC543135
<i>Antrodia macra</i>			KC543132
<i>Antrodia macra</i>			KC543139
<b><i>Antrodia heteromorpha</i></b>			
<i>Antrodia heteromorpha</i> Dai 1571		<i>Picea glauca</i>	JQ837938
<i>Antrodia heteromorpha</i> Harkonen 20-X-2008 (H)	FI	<i>Picea abies</i>	KC543177
<i>Antrodia heteromorpha</i> Klepsland S-338 (O)	NO	<i>Salix caprea</i>	KC543151
<i>Antrodia heteromorpha</i> Vlasák 8608/10 (JV)	CZ	<i>Alnus</i>	KC543115
<i>Antrodia heteromorpha</i> Klepsland JK07-S023 (O)	NO	<i>Alnus incana</i>	KC543152
<i>Antrodia heteromorpha</i>			AF533964
<i>Antrodia heteromorpha</i> Hellik Hofton 06124 (O)	NO	<i>Salix caprea</i>	KC543154
<i>Antrodia heteromorpha</i> Kosolapov VIII-2003 (H)	RU	<i>Picea abies</i>	KC543144
<i>Antrodia heteromorpha</i> Hellik Hofton 98X5 (O)	NO	<i>Populus tremula</i>	KC543153
<i>Antrodia heteromorpha</i> Klepsland JK07-S064 (O)	NO	<i>Alnus incana</i>	KC543155
<i>Antrodia heteromorpha</i> Vlasák 0409/13 (JV)	CZ	<i>Picea abies</i>	KC543123
<i>Antrodia heteromorpha</i>			KC543141

<i>Antrodia heteromorpha</i>			KC543133
<b><i>Antrodia serpens</i></b>			
<i>Antrodia serpens</i> Rivoire 3576 (LY)	FR	<i>Malus</i>	KC543169
<i>Antrodia serpens</i> Rivoire 3176 (LY)	FR	<i>Papulus nigra</i>	KC543167
<i>Antrodia serpens</i>			KC543143
<i>Antrodia serpens</i> Vlasák 9610/18 (JV)	SK	<i>Salix caprea</i>	KC543124
<i>Antrodia serpens</i> Vlasák 8210/3 (JV)	SK	<i>Quercus</i>	KC543118
<i>Antrodia serpens</i> Vlasák 9610/22 (JV)	SK	<i>Quercus</i>	KC543111
<i>Antrodia serpens</i>			AJ006680
<i>Antrodia serpens</i>			KC543137
<b><i>Antrodia mappa</i></b>			
<i>Antrodia mappa</i> Niemelä 3573 (H)	FI	<i>Papulus tremula</i>	KC543162
<i>Antrodia mappa</i> Penttilä 11756 (H)	FI	<i>Papulus tremula</i>	KC543113
<i>Antrodia mappa</i> Vlasák 0509/170 (JV)	US	<i>Fence</i>	KC543131
<b><i>Antrodia neotropical</i></b>			
<i>Antrodia neotropica</i> (ACM 628a Flor0054193)	BR	<i>Baccharis</i> sp.	
<i>Antrodia neotropica</i> (ACM 628B Flor0054194)	BR	<i>Baccharis</i> sp.	
<i>Antrodia neotropica</i> (GKF 43 Flor0054183)	BR	<i>Baccharis uncinella</i>	
<i>Antrodia neotropica</i> (GKF 44 Flor0054184)	BR	<i>Baccharis uncinella</i>	
<i>Antrodia neotropica</i> (GKF 46 Flor0054186)	BR	<i>Baccharis uncinella</i>	
<i>Antrodia neotropica</i> (GKF 47 Flor0054187)	BR	<i>Baccharis uncinella</i>	
<i>Antrodia neotropica</i> (GKF 48 Flor0054188)	BR	<i>Baccharis uncinella</i>	
<i>Antrodia neotropica</i> (GKF 49 Flor0054198)	BR	<i>Baccharis uncinella</i>	
<i>Antrodia neotropica</i> (GKF 50 Flor0054190)	BR	<i>Baccharis uncinella</i>	
<b><i>Fomitopsis</i></b>			
<i>Fomitopsis ostreiformis</i>			HQ248222

---



TABLE II. Basidiospores size in the *Antrodia* s.s. species. T: type specimen; \*: average values taken from Spirin et al. (2013), †:  $\bar{X}$  (arithmetic average) estimated as Median values of size range taken from literature,  $\bar{Q}$  = ratio length/width calculated from  $\bar{X}$ .

Species /Specimens/Reference	Basidiospores		
	Size range	$\bar{Q}$	$\bar{X}$
<b><i>Antrodia neotropica</i></b>			
FLOR0054184 GKF44 (T)	(8.0–) 8.0–12.1 (–14.0) × (3.5–) 4.0–5.0 (–5.0)	10.09 × 4.26	2.37
FLOR0054185 GKF 45	(10–) 10.0–13.0 (–14.0) × (4.0–) 4.0–4.5 (–5.0)	11.29 × 4.25	2.67
FLOR0054189 GKF 49	(8.5–) 9.0–11.0 (–12.0) × (4.0–) 4.0–5.0 (–5.0)	10.01 × 4.54	2.23
FLOR0054190 GKF 50	(9.0–) 10.0–12.0 (–12.0) × (4.0–) 4.0–5.0 (–6.0)	10.89 × 4.34	2.53
FLOR0054206 DS 1109	(9.0–) 11.0–14.1 (–15.0) × (4.0–) 4.0–5.0 (–5.0)	12.49 × 4.61	2.74
FLOR0054202 DS 1101	(10–) 10.0–15.0 (–16.0) × (4.0–) 4.0–5.0 (–5.0)	11.96 × 4.68	2.59
FLOR0054194 ACM 628b	(7.0–) 8.0–10.0 (–12.0) × (4.0–) 5.0–6.0 (–6.0)	9.58 × 5.00	1.92
FLOR0054203 DS 1103	(9.0–) 9.0–11.0 (–12.0) × (4.0–) 4.0–5.0 (–5.0)	10.06 × 4.90	2.06
	<b>Arithmetic average of individuals</b>	<b>10.48 × 4.39</b>	<b>2.40</b>
<b><i>Antrodia heteromorpha</i> *</b>	(6.4–) 7.6–12.6 (–15.6) × (3.0–) 3.6–5.4 (–6.4)	10.06 × 4.45	2.26
<b><i>Antrodia serpens</i> *</b>	(6.3–) 8.0–12.6 (–14.4) × (2.9–) 3.6–5.3 (–6.0)	9.99 × 4.40	2.27
<b><i>Antrodia favescens</i> *</b>	(6.1–) 6.4–9.4 (–11.4) × (2.5–) 2.8–4.1 (–4.4)	8.02 × 3.39	2.36
<b><i>Antrodia tanakai</i> *</b>	(6.1–) 6.4–10.4 (–12.0) × (2.6–) 2.8–4.3 (–4.7)	8.36 × 3.36	2.41
<b><i>Antrodia macra</i> †</b>			
Niemelä (1985)	9.0 × 3.5	9.0 × 3.5	2.57
Gilbertson & Ryvarden (1993)	9.0–12.0 × 3.5–4.5	10.5 × 4.0	2.63
Ryvarden & Melo (2014)	7.2–11.0 × 2.9–4.5	9.1 × 3.7	2.46
	<b>Arithmetic average of references</b>	<b>9.53 × 3.73</b>	<b>2.55</b>

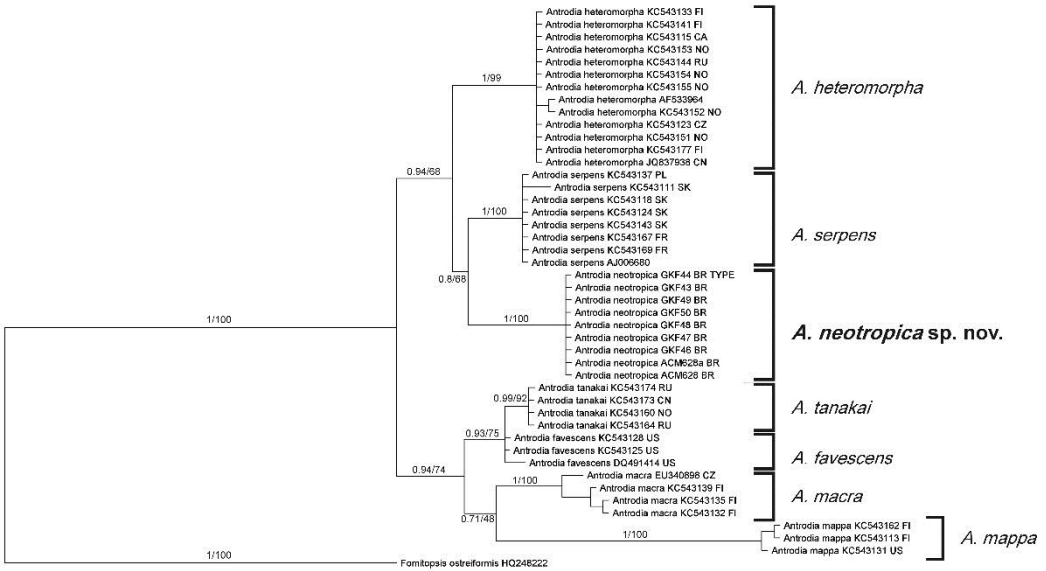


Figure 1.

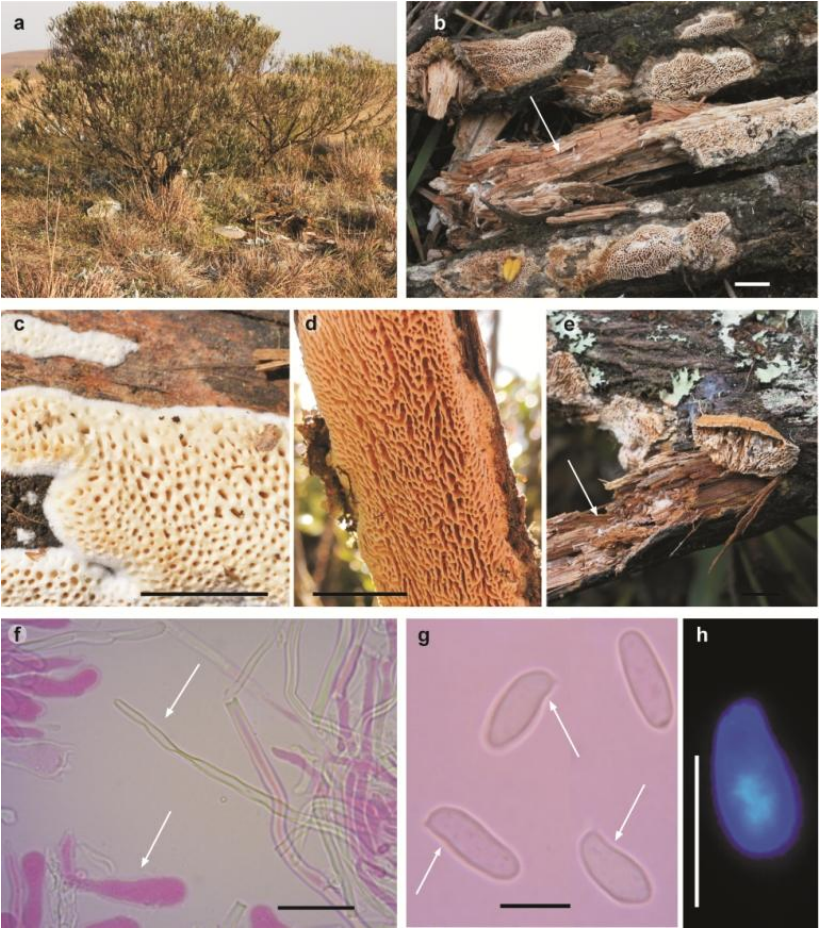


Figure 2.

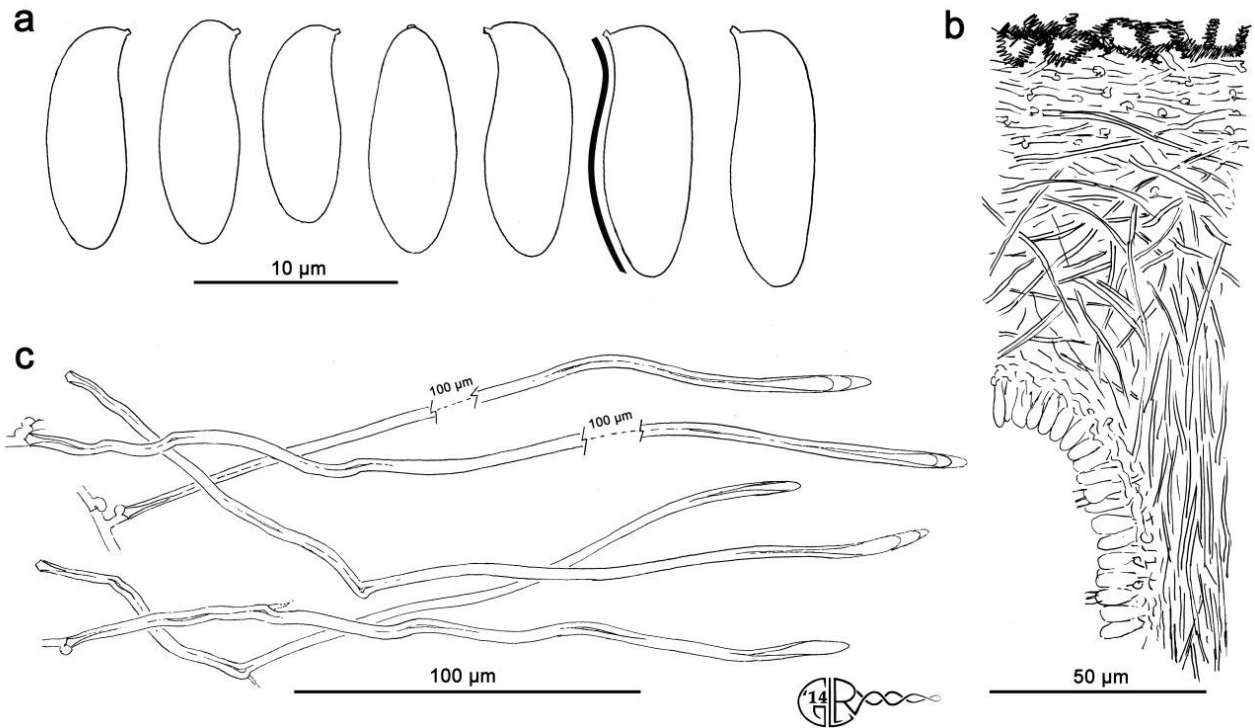


Figure 3.

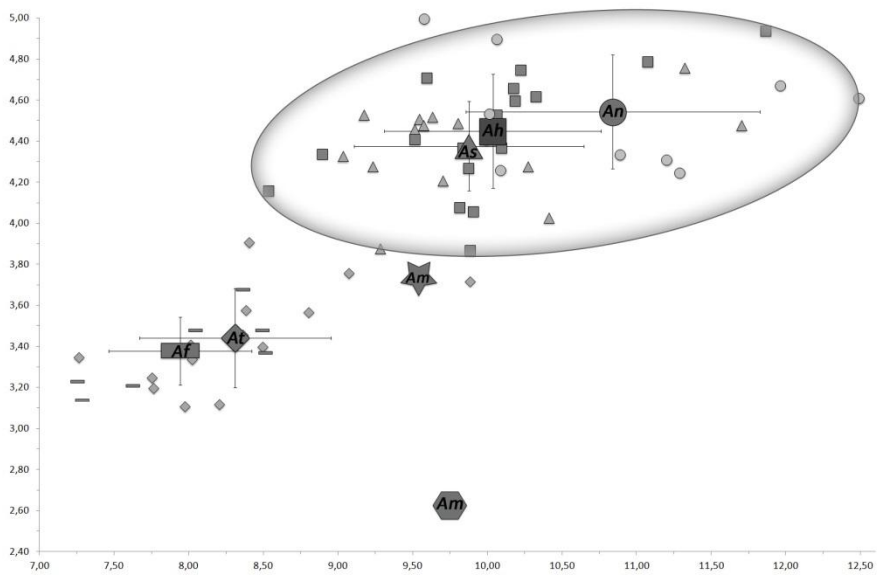


Figure 4.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Antrodia* é considerado um dos principais gêneros causadores de podridão marrom com um expressivo número de espécies descritas.

Neste trabalho uma nova espécie de *Antrodia* s.s. é proposta, a inclusão de um membro Neotropical na filogenia do gênero, descrito como restrito as regiões temperadas da América do Norte e Europa, faz com que novos caracteres sejam considerados (distribuição geográfica) e novidades científicas ainda podem surgir. Táxons com ampla distribuição geográfica devem ser analisados com cuidado, pois podem representar complexos de espécies ou ainda espécies crípticas.

Com inclusão de amostras Neotropias, análises morfológicas detalhadas (macro, micro e ultraestrural) juntamente com estudo filogenéticos *multiloci*, novos gêneros poderão ser propostos, contribuindo para a resolução do “*core antrodia group*”.

## REFERÊNCIAS

- Baltazar JM, Trierweiler-Pereira L, Loguercio-Leite C. 2009. A checklist of xylophilous basidiomycetes (Basidiomycota) in mangroves. *Mycotaxon* 107: 221–224.
- Bernicchia A, Gorjón SP, Vampola P, Ryvarden L, Prodi A. 2012. A phylogenetic analysis of *Antrodia s.l.* based on nrDNA ITS sequences, with emphasis on rhizomorphic European species. *Mycol Prog* 11:93–100.
- Binder M, Hibbett DS, Larsson KH, Larsson E, Langer E, Langer G. 2005. The phylogenetic distribution of resupinate forms across the major clades of mushroom-forming fungi (Homobasidiomycetes). *Syst Biodivers* 3:113–157.
- Chiu HH. 2007. Phylogenetic analysis of *Antrodia* species and *Antrodia camphorata* inferred from internal transcribed spacer region. *A van Leeuwenhoek* 91:267–276.
- Cléménçon, H. 2012. Cytology and plectology of the Hymenomycetes. J. Cramer, Stuttgart.
- Cui BK, Li HJ, Dai YC. 2011. Wood-rotting fungi in eastern China 6. Two new species of *Antrodia* (Basidiomycota) from Mt Huangshan, Anhui Province. *Mycotaxon* 116: 13–20, doi:10.5248/116.13
- Cui BK, Dai YC. 2013. Molecular phylogeny and morphology reveal a new species of *Amyloporia* (Basidiomycota) from China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104:817–827.
- Cui BK. 2013. *Antrodia tropica* sp. nov. from southern China inferred from morphological characters and molecular data. *Mycol Prog* 12: 223–230.
- Donk M.A. 1964. A conspectus of the families of *Aphylliphorales*. *Persoonia*: 3(2):199–324.
- Drechsler-Santos ER, Groposo C, Loguercio-Leite C. 2008. Additions to the knowledge of lignocellulolytic Basidiomycetes (Fungi) in forests from Santa Catarina State, Brazil. *Mycotaxon* 103: 197–200.

Drechesler-Santos ER, Cavalcanti MA, Loguercio-Leite C, Robledo G. 2012. On Neotropical *Daedalea* species: *Daedalea ryvarđenica* sp. nov. *Kurtziana* 37:65-72.

Han ML, Cui BK. 2014. Morphological characters and molecular data reveal a new species of *Fomitopsis* (Polyporales) from southern China. *Mycoscience* xxx: 1-9.

Hibbett DS, Donoghue MJ. 2001. Analysis of character correlations among wood decay mechanism, mating systems, and substrate ranges in Homobasidiomycetes. *Systematic Biology* 50:215-242.

Katoh K, Toh H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefing Bioinformatic* 9:286–298, doi:10.1093/bib/bbn013

Kim KM, Yoon YG, Jung HS. 2005. Evaluation of the monophyly of *Fomitopsis* using parsimony and MCMC methods. *Mycologia* 97:812–822.

Kim KM, Lee JS, Jung HS. 2007. *Fomitopsis incarnatus* sp. nov. based on generic evaluation of *Fomitopsis* and *Rhodofomes*. *Mycologia* 99:833–841.

Kim SY, Jung HS. 2000. Phylogenetic relationships of the *Aphyllophorales* inferred from sequence analyses of nuclear small subunit ribosomal DNA. *J Microbiol* 38: 122–131.

Kim SY, Park SY, Jung HS. 2001. Phylogenetic classification of *Antrodia* and related genera based on ribosomal RNA internal transcribed spacer sequences. *J Microbiol Biotechnol* 11:475–481.

Kim SY, Park SY, Ko KS, Jung HS. 2003. Phylogenetic analysis of *Antrodia* and related taxa based on partial mitochondrial SSU rDNA sequences. *A van Leeuwenhoek* 83:81–88.

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10rd edition, CAB International, United Kingdom.

Leal GR, Gugliotta AM. 2008. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Fungos*, 9: Meripilaceae. *Hoehnea* 35(1):99-110.



- Li HJ, Cui BK. 2013a. Two new *Daedalea* species (Polyporales, Basidiomycota) from south China. *Mycoscience* 54:62–68.
- Li HJ, Han ML, Cui BK. 2013b. Two new *Fomitopsis* species from southern China based on morphological and molecular characters. *Mycol Prog* 12:709–718.
- Lindner DL, Ryvarden L, Baroni TJ. 2011. A new species of *Daedalea* (Basidiomycota) and a synopsis of core species in *Daedalea sensu stricto*. *N Am Fungi* 6:1–12.
- Meijer AAR de. 2006. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian state of Paraná. *Bol. Mus. Bot. Munic.* 68: 1–55.
- Munsell. 1975. *Soil Colors Charts*. Baltimore, Maryland: Munsell Color.
- Ortiz-Santana B, Lindner DL, Miettinen O, Justo A, Hibbett DS. 2013. A phylogenetic overview of the antrodia clade (Basidiomycota, Polyporales). *Mycologia* 105 (6):1391–1411.
- Rajchenberg M, Gorjón SP, Pildain MB. 2011. The phylogenetic disposition of *Antrodia s.l.* (Polyporales, Basidiomycota) from Patagonia, Argentina. *Aust Syst Bot* 24:111–120.
- Reck MA, Silveira RMB. 2008. Polyporales (Basidiomycota) no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre* 6 (3): 301–314.
- Ryvarden L. 1991. Genera of polypores. Nomenclature and taxonomy. *Synopsis fungorum* 5. Fungiflora: Oslo, Norway.
- Ryvarden L, Gilbertson R. L. 1993. European polypores. Part 1. *Fungiflora*: Oslo, Norway.
- Spirin V, Miettinen O, Pennanen J, Kotiranta H, Niemelä T. 2012. *Antrodia hyalina*, a new polypore from Russia, and *A. leucaena*, new to Europe. *Mycol Prog*, doi:10.1007/s1155701208150.
- Spirin V, Vlasák J, Niemela T, Miettinen O. 2013. What is *Antrodia sensu stricto* (Polyporales, Basidiomycota). *Mycologia* 105(6) 1555-1576.

Teixeira, A.R. 1995. Método para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos. Manual nº6. Instituto de Botânica, São Paulo.

Thiers B. Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Garden's Virtual Herbarium. In: New York Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/ih/>.

Trierveiler-Pereira L, Baltazar JM, Loguercio-Leite C. 2009. Santa Catarina Island mangroves 4 – xylophilous basidiomycetes. *Mycotaxon* 109: 107–110.

Yu ZH, Wu SH, Wang DM, Chen CT. 2010. Phylogenetic relationships of *Antrodia* species and related taxa based on analyses of nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Bot Stud* 51:53–60.