

Mariana Fernandes

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Phellinotus piptadeniae*
(Teixeira) Drechsler-Santos & Robledo NA ILHA DE
SANTA CATARINA**

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: Gustavo Henrique Ferrero Klabunde

Florianópolis

2017

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

Fernandes, Mariana Fernandes
DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Phellinotus piptadeniae*
(Teixeira) Drechsler-Santos & Robledo NA ILHA DE
SANTA CATARINA / Mariana Fernandes Fernandes ;
orientador, Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos
Drechsler dos Santos, coorientador, Gustavo
Henrique Ferrero Klabunde Klabunde, 2017.
88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos,
Algas e Plantas, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2.
Phellinotus piptadeniae. 3. Diversidade genética.
4. Genética de populações. 5. *Piptadenia*
gonoacantha. I. Drechsler dos Santos, Elisandro
Ricardo Drechsler dos Santos. II. Klabunde, Gustavo
Henrique Ferrero Klabunde. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

A todos que me ensinaram, a todos que ensinei, dedico esse e todos os trabalhos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Ricardo Drechsler pelo cuidado, paciência, confiança e pela oportunidade em poder realizar esse trabalho sob sua orientação.

Ao Gustavo Klabunde, pesquisador e tanto! Que seguiu conosco na Coorientação desse trabalho.

Agradeço imensamente ao professor Eduardo Bagagli, da UNESP de Botucatu, exemplo de pessoa e profissional, pela oportunidade dada a mim de seguir nacaminhada pela estrada micológica.

Aos queridos Assis, Thales, Raquel pela amizade sincera da UNESP para ao mundo.Me ensinaram muito do pouco que sei.

Aos Colegas do Micolab UFSC, contemporâneos ou não, pela parceria, pelas risadas, pela comilança, pelo aprendizado. Especialmente ao Samuel, irmão micológico e à MariDê melhor amiga de militância, de luta, de viagens, de pipoca com chimarrão.

À professora Maria Alice, mulher da ciência, guerreira e de generosidade que transborda.

À turma do PPGFAP 2015: Pelas cervejas e bom papo; pelos churrascos com carne queimada; pelos almocinhos de domingo na casa da querida Grazi.

Aos trabalhadoras e trabalhadores do departamento de Botânica que contribuem para que a energia do ambiente de trabalho seja sempre muito positiva, especialmente, agradeço ao Seu Ademir e aos chefes de expediente que foram contemporâneos.

À coletiva feminista Mítia Bonita e às mulheres de luta!

À turma XLV de Biologia da UNESP de Botucatu: pela honra, pela garra e pela coragem.

À minha mãe, Iris, que não mede esforços na educação de seus filhos, e que sempre me pergunta quando eu vou parar de estudar.

Ao povo brasileiro que contribui para a manutenção da qualidade e excelência dessa Universidade que me forma.

Aos micólogos! Micólogos do mundo: Uni-vos!

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas (PPGFAP) por toda a estrutura disponibilizada para minha formação e a todos os professores do programa pelo conhecimento partilhado.

À CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pelo fomento.

Gratidão, gratidão!

“Privatizaram sua vida, seu trabalho, sua hora de amar e seu direito de pensar. É da empresa privada o seu passo em frente, seu pão e seu salário. E agora, não contentes, querem privatizar o conhecimento, a sabedoria, o pensamento, que só à humanidade pertencem.”

Bertolt Brecht

“Fica proibido o uso da palavra liberdade, a qual será suprimida dos dicionários edo pântano enganoso das bocas. A partir deste instante a liberdade será algo vivo e transparente como um fogo ou um rio, e a sua morada será sempre o coração do homem”.

Thiago de Mello

RESUMO

Phellinotus é um gênero pertencente à Hymenochaetaceae, caracterizado por produzir basidiomas perenes, pileados, aplanadas a unguladas, com uma distinta linha negra resinosa que divide o contexto. Micromorfológicamente, não apresenta setas, mas possui sistema hifal monomítico no contexto e dimítico na trama himenoforal, os basidiósporos elipsoides, de coloração amarelo-pálido, de paredes espessadas, xantocróicas e ventralmente achadados. Geograficamente, *Phellinotus* está restrito à região Neotropical. Dentre as espécies, *Phellinotus piptadeniae* foi descrita em 1950, por Teixeira, a partir de espécimes encontrados parasitando *Piptadenia gonoachanta*, o pau jacaré (fabaceae), espécie vegetal frequentemente encontrada na Mata Atlântica. O presente trabalho apresenta elementos para compreender as bases populacionais dessa espécie de fungo parasita facultativo, na Ilha de Santa Catarina. Para tal, foram feitas coletas em sete localidades (uma no norte da ilha, uma no Sul da ilha e cinco na região central), de onde foram extraídos DNA totalde 74 espécimescoletados em hospedeiro vivo de pau jacaré. Marcadores usados foramATP6, ITS, RPB2, EF1- α e β -TUB, obtendo-se48, 43, 35, 21, 12 sequências respectivamente.O tratamento dos dados se deu a partir de análises baseadas na diversidade de haplótipos, diversidade de nucleotídeos,

testes de neutralidade e *Mismatch Distribution*. Os resultados indicam que os organismos estão em pammixia na ilha de Santa Catarina. Não há estruturação, o que significa que existe uma única população. Há evidências de que, embora haja fluxo gênico entre os indivíduos coletados nas diferentes localidades, a população passou por um evento de redução de indivíduos e se encontra em expansão. A população apresenta alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica. A hipótese de expansão recente teve suporte com o resultado significativo do Teste F_s de Fu & Li para um dos marcadores usados (ATP6), indo ao encontro do perfil da curva unimodal encontrada, que também reitera a hipótese de expansão. Os demais marcadores (RPB2, EF1- α , e β -TUB) não tiveram quantidades de sequências suficientes para as análises e ITS não demonstrou resultados estatisticamente significativos. Porém, a amostragem pode ter tido significativa influência visto que qualquer mutação já diminuiria o valor dos testes estatísticos pois a quantidade de sequências usadas foram baixas.

Palavras-Chave: *Phellinotus piptadeniae*; Diversidade genética; Genética de Populações; *Piptadenia gonoacantha*.

ABSTRACT

Phellinotus is a genus belonging to Hymenochaetaceae, characterized by perennial basidiomata, pileate, flattened to unguulate, with a distinct black resinous line that divides the context. Micromorphologically, *Phellinotus* does not present setae, but it has a monomythic hifal system in the context and dimyctic hifal system in the hymeniae, ellipsoid, pale yellow thick walled, xanthocroic and ventrally diseased basidiospores. Geographically, *Phellinotus* is restricted to the Neotropical region. Among the species, *Phellinotus piptadeniae* was described in 1950 by Teixeira, from specimens found parasitizing *Piptadenia gonoachanta*, a species frequently found in the Atlantic Forest. The present work presents elements to understand the population bases of this fungus species belonging to Hymenochaetaceae, on the Island of Santa Catarina. For this, the basidiomata was collected in seven locations along the Island of Santa Catarina (one in the north, one in the South and five in the central region of the Island). Were extracted total DNA of 74 specimens, all collected in a live host. The PCR reaction was made with molecular markers for five gene regions (ATP6, ITS, RPB2, EF1- α and β -TUB), yielding 48, 43, 35, 21, 12 sequences respectively for each of these markers. The treatment of the data was based on analyzes based on the diversity of haplotypes, nucleotide diversity, neutrality tests and

Mismatch Distribution. The results indicate that the organisms are in panmixia on the island of Santa Catarina. There is no structuring, which means that there is only one population. There is evidence that, although there is gene flow among the individuals collected in the different localities, the population underwent an event of reduction of individuals and is in expansion. The population presents high haplotypic diversity and low nucleotide diversity. The recent expansion hypothesis was supported by the significant result of the F_u F_s Test for one of the used markers (ATP6), meeting the profile of the unimodal curve found, which also reiterates the hypothesis of expansion. The remaining markers (RPB2, EF1- α and β -TUB) did not have sufficient sequence numbers for the analyzes and ITS did not demonstrate statistically significant results. However, sampling may have had significant influence since any mutation already decreases the value of the tests.

Key-Words: *Phellinotus piptadeniae*; Genetic Diversity; Populations Genetic; *Piptadenia gonoacantha*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Caracteres morfológicos de *Phellinotus piptadeniae*. Características Macromorfológicas (a) superfície superior do píleo; (b) himenóforo (parte inferior do Píleo); (c) detalhe da linha negra do contexto; (d) contexto e tubos; Características Microscópicas (e) esporo em água. (f) esporo em KOH 3% (reação xantocróica). (g) Esquemas das hifas generativas; (h) esquemas das hifas esqueletais. Fonte: Salvador-Montoya et al. (2015).....26
- Figura 2:** Mapa da região ITS do rDNA (Torres-Machorro, 2010) utilizado como um das regiões gênicas no presente trabalho.....33
- Figura 3:** Mapa da região gênica para o marcador RPB2, utilizado como um dos marcadores e as regiões de ancoragem dos *primers*.....33
- Figura 4:** Esquema do mtDNA com suas respectivas regiões genéticas, incluindo a região ATP6, utilizada no presente trabalho.....34

Figura 5: Mapa da região gênica β -tubulina, marcador molecular utilizado no presente trabalho.....34

Figura 6: Mapa da região EF1 e EF2 (Geiser et al. 2004), marcador molecular utilizado no presente trabalho.....35

Figura 7: Distribuição geográfica de ocorrência natural do Pau Jacaré – *Piptadenia gonoachanta*(Mart.)J.F.Macbr.....36

Figura 8:Pau Jacaré. Figura (a) Destaque para os acúleos; (b) Detalhe para a filotaxia - folhas alternas, compostas bipinadas (Foto: Raissa Nagaoka); (c) Detalhe dos frutos (Fonte: EMBRAPA).....38

Figura 9: Mapa da Ilha de Santa Catarina, Brasil, com (A) localização da Ilha de santa Catarina no mapa do Brasil e no mapa do estado (B) os pontos das Localidades de coleta de *Phellinotus piptadeniae*, realizadas nas partes norte, centro e sul da Ilha, em hospedeiro vivo de *Piptadenia gonoacantha*.....47

Figura 10: Gel de agarose a 0.8% que representa o padrão de bandas dos *amplicons* purificados para o *primer* ATP6. **M:** Marcador 1 kb DNA *ladder*(New England BioLabs); **1 a 17:** Produtos de amplificação marcador ATP6.....52

Figura 11: Gel de agarose a 0.8% que representa o padrão de bandas dos *amplicons* purificados para os *primer* β -TUB. **M:** Marcador 1 kb DNA *ladder*(New England BioLabs); **1 a 14:** Produtos de amplificação marcador β -TUB.....52

Figura 12. Representação gráfica da curva gerada pelas diferenças par a par das sequências (*Mismatch Distribution*) da região ATP6 para os organismos de *Phellinotus piptadeniae* amostradas na Ilha de Santa Catarina sobre hospedeiro vivo de *Piptadenia gonoacantha*. A distribuição esperada de diferenças par a par, é mostrada em linha contínua e a distância observada pela linha pontilhada.....59

Figura 13. Representação gráfica da curva gerada pelas diferenças par a par das sequências (*Mismatch Distribution*) da região ITS para os organismos de *Phellinotus piptadeniae* amostradas na Ilha de Santa Catarina sobre hospedeiro vivo de *Piptadenia gonoacantha*. A distribuição esperada de diferenças par a par, é mostrada em linha contínua e a distância observada pela linha pontilhada.....59

Figura 14. Rede de haplótipos não enraizada baseada na sequência parcial da região ITS. O tamanho das áreas das formas geométricas é proporcional à frequência dos haplótipos. Cada linha da rede representa um passo mutacional. Haplótipos hipotéticos, não amostrados, são representados por pequenos círculos vazios.....60

Figura 15. Rede de haplótipos não enraizada baseada na sequência parcial da região ATP6. O tamanho das áreas das formas geométricas é proporcional à frequência dos haplótipos. Cada linha da rede representa um passo mutacional. Haplótipos hipotéticos, não amostrados, são representados por pequenos círculos vazios.....61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relação de espécimes estudados de *Phellinotus piptadeniae* coletados em *Piptadenia gonoacantha*, com informações sobre número de coletor, localidade, coordenadas geográficas dos indivíduos coletados.....43
- Tabela 2.** Componentes e concentrações utilizadas nas reações de amplificação PCR para os cinco marcadores moleculares utilizados.....49
- Tabela 3.** Condições de ciclagem (temperatura °C e tempo) para a amplificação por PCR dos cinco marcadores moleculares usados.49
- Tabela 4.** Marcadores genéticos utilizados e número de sequências obtidas para cada um deles, respectivamente, de coletas de *Phellinotus piptadeniae* realizadas em hospedeiros vivos de *Piptadenia gonoacantha* Ilha de Santa Catarina.....55
- Tabela 5.** Diversidade genética de *Phellinotus piptadeniae* nas localidades de coleta (Centro, Sul e Norte da Ilha de Santa Catarina) baseados nos dados gerados pela análise das sequências

parciais de ITS e ATP6. N = Número de sequências; h = Número de Haplótipos; S = Número de sítios polimórficos/segregantes; $\square\square$ = Diversidade Nucleotídica; Hd = Diversidade Haplotípica.....56

Tabela 6. Resultados dos testes de Neutralidade baseado nos testes para as regiões ITS e ATP6 de *Phellinotus piptadeniae* da Ilha de Santa Catarina coletados em hospederiro vivo de *Piptadenia gonoacantha*. **F** - Teste F de Fu&Li; **D** – Teste D de Fu&Li. = F.....57

Tabela 7. Diferenciação entre os valores dos índices F_{ST} (diagonal superior) e G_{ST} (diagonal inferior) para o marcador molecular ITS com as respectivas localidades de coleta de *Phellinotus piptadeniae* coletados em hospedeiro vivo de *Piptadenia gonoacantha*.....58

Tabela 8. Diferenciação entre os valores dos índices de F_{ST} (diagonal superior) e G_{ST} (diagonal inferior) para o marcador molecular ATP6 com as respectivas localidades de coleta de *Phellinotus piptadeniae* coletados em hospedeiros vivos de *Piptadenia gonoacantha*.....58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E EXPRESSÕES

°C - Graus Celcius

β-tub - A Os membros mais usuais da família da tubulinas, proteínas globulares.

μg – Micrograma

μl – Microlitro

μm - Micrômetro

μM – Micromolar

A – Adenina (nucleobase)

Amplicon – produto amplificado pós reação de PCR.

ATP – Trifosfato de adenosina

atp-sintase - enzimas que fornecem energia para o funcionamento das células através da síntese de ATP (trifosfato de adenosina)

ATP6 – ATP sintase 6

Benth - George Bentham, Botânico.

bp - Base pairs - Pares de base

C – Citosina (nucleobase)

C.A.T.O. – Cauê Azevedo Tomaz Oliveira, micólogo.

C.D. – Charles Darwin

Contig - Sequência contígua, formada pela sobreposição de leituras em determinado alinhamento

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio

dATP - desoxiadenosina trifosfatada

dCTP - desoxicitosina trifosfatada

dGTP- desoxiguanosina trifosfatada

dTTP - desoxitimidina trifosfatada

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

Doweld – Alexander Doweld, Botânico

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

EF1a - *Elongation factor 1-alpha, fator de alongação.*

G – Guanina (nucleobase)

g – Gramas

gtp – *guanosita trifosfato*

gtpAS - família de enzimas hidrolases que se ligam e hidrolizam o GTP

housekeeping - proteínas essenciais para a manutenção da vida, normalmente envolvida em processos básicos como geração de energia, replicação e manutenção do material genético.

hotspot – definida pela a quantidade de espécies endêmicas e o tamanho da área degradada.

in silico - Caracterização, modelagem computacional

indel - Inserções ou deleções de bases nitrogenadas em determinada sequência de DNA/RNA

intron - INTRagenic regiON - região intra-gênica, excisada durante a etapa de *splicing*

IGS – região espaçadora intergênica

ITS - Internal transcribed spacer

J.S.F. - João Salvador Furtado. Biólogo, educador

kb – kpb – Kilo Bases = 1.000 pb

KOH –Hidroxido de potássio

l - Litro

M - Molar

M.A – Machado de Assis, escritor.

mg – Miligrama

M.G. – Marcelo Geneci, músico e compositor.

ml - Mililitro

mm – Milímetro

M.M. – Moraes Moreira, musico e compositor.

mtDNA - DNA mitocondrial

mRNA - RNA mensageiro

NaCl – Cloreto de sódio

NCBI – *National Center for Biotechnology Information* - Centro Nacional para Informações Biotecnológicas, EUA

ng/μl – Nanogramas/microlitro

pb – Pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction* - Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

primer - iniciador molecular refere-se a uma sequência de oligonucleótidos, escrita na direção 5'→3', que marca as extremidades da sequência de DNA alvo que se pretende sintetizar.

PVP – Polivinilpirrolidona

P-value - é a probabilidade de se obter uma estatística de teste igual ou mais extrema que aquela observada em uma amostra, sob a hipótese nula

RNA – Ácido Ribonucleico

Rocha ígnea – rocha oriunda da consolidação devida ao resfriamento do magma derretido ou parcialmente derretido.

Rocha Metamórfica - rochas que resultam da transformação da rocha original, sejam transformações químicas e físicas devido ao fato de se submeter a temperaturas e pressões elevadas e à atuação de em zonas profundas da crosta terrestre

RPB2 - RNA polymerase II second largest subunit

RPM – Rotações por minuto

rRNA - RNA ribossômico ou ribossomal

RT - Reação de transcrição reversa mediada pela enzima Transcriptase reversa

s – Segundos

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism* - Polimorfismo de base única

T – Timina (nucleobase)

TE - Tampão contendo Tris-base e EDTA

tRNA – RNA transportador

U – Unidade enzimática

xg – Força centrífuga relativa

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
1. REINO FUNGI – ONDE TUDO COMEÇA.....	2
2. HYMENOGYSAETACEAE Donk, A FAMÍLIA.	4
3. <i>PELLINUS</i> s.l.....	5
4. DE <i>PELLINUS</i> A <i>PELLINOTUS</i>	6
5. <i>PELLINOTUS PIPTADENIAE</i> : HISTÓRIA NATURAL NO CONTEXTO DA DIVERSIDADE	12
6. GENÉTICA DE POPULAÇÕES	15
7. MARCADORES MOLECULARES	20
8. O HOSPEDEIRO - <i>Da estrada que não cabe onde termina (M.G.)</i> 28	
8.1 A Planta e a Mata Atlântica:	28
8.2 A Geologia, o histórico do uso da Ilha de Santa Catarina, e a relação com a distribuição do Pau Jacaré:	34
9. OBJETIVOS	39
9.1 Gerais:	39
9.2 Específicos:	39
10. MATERIAL E MÉTODOS	40
10.1 Populações em estudo e estratégia de coleta.....	40
10.2 Extração de DNA total.....	45
10.3 Quantificação de DNA Total	48
10.4 Padronização da amplificação via reação em cadeia da polimerase – PCR	48

10.5	Purificação pós-amplificação.....	52
10.6	Reações de sequenciamento.....	53
10.7	Alinhamento e montagem de sequências.....	53
10.8	Análises genéticas.....	54
10.8.1	Análise dos Dados - Leitura das Sequências.....	54
10.8.2	Parâmetros intra populacionais.....	54
10.8.3	Testes de Neutralidade.....	55
10.8.4	<i>Mismatch Distribution</i>	55
10.8.5	Distâncias Genéticas.....	56
11.	RESULTADOS.....	57
11.1	Análises das sequências.....	57
11.2	Testes de Neutralidade.....	60
11.3	<i>Mismatch Distribution</i>	62
12.	DISCUSSÃO.....	64
12.1	Os marcadores e a variabilidade.....	65
12.3	Índices de Diversidade e Neutralidade:.....	70
12.4	<i>Mismatch distribution</i> – distribuição de diferença par a par....	73
12.5	O fluxo gênico e a dispersão de esporos.....	79
12.5.1	<i>O que determina a abundância e a distribuição de uma espécie?</i>	84
12.6	Implicações para a conservação:.....	86
13.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
14.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho consiste em uma imersão teórico-prática sobre as bases do estudo de genética de populações em macro fungos sob a perspectiva da necessidade de acessar e conhecer a diversidade genética em fungos no contexto da conservação. Para tal, o organismo modelo escolhido foi *Phellinotus piptadeniae*. A investigação vai ao encontro da diversidade genética no sentido de sua dinâmica e estrutura, assim como as variações ocorridas na(s) população(ões) destes organismos na Ilha de Santa Catarina.

Foi seguido o modelo tradicional de dissertação subdividido em Introdução com fundamentação teórica, Objetivos e Questões orientadoras da pesquisa, Material e Métodos, Resultados obtidos e Discussão, que dialoga com estudos de diferentes grupos de organismos, e Considerações Finais.

Todas as referências bibliográficas citadas na Introdução, Material e Métodos Resultados e Discussão são apresentadas depois das Considerações Finais.

Boa Leitura!

1.REINO FUNGI – ONDE TUDO COMEÇA

O Reino Fungi, segundo estimativas, reúne cerca 5,1 milhões de espécies (Hawksworth, 1991; Blackwell, 2011), o que o torna um reino megadiverso, mas ainda que contraditório, é pouco conhecido: apenas cerca de 100 mil espécies são reconhecidas e, em sua maioria, aqueles fungos que são macroscópicos pertencentes a dois Filos, Ascomycota (\approx 64 mil espécies) e Basidiomycota (\approx 32 mil espécies) (Kirk et al. 2008; Moore et al. 2011). Agora, se fizermos uma comparação com o que a literatura reúne de conhecimento e conservação para plantas e fungos, cerca de 400 mil espécies vegetais são conhecidas, e 28% destas estão incorporadas às coleções biológicas (Guerrant et al. 2004), enquanto para fungos, apenas 16% das espécies conhecidas são encontradas nos bancos de dados (Hawksworth, 2004).

Diversidade aqui, no contexto micológico, se encaixa perfeitamente não só no que diz respeito à quantidade de seres, mas às diferentes formas de vida que encontramos (simbiontes, decompositores, endofíticos, fito/entomopatógenos).

Os fungos são seres eucariontes, de parede celular quitinosa, e com ergosterol presente na membrana celular. Podemos encontrar seres unicelulares como as leveduras, ou multicelulares filamentosos, podendo ser criaturas visíveis apenas com auxílio de microscópio até apresentar estruturas reprodutivas macroscópicas. Alguns são fermentadores, outros são heterótrofos por absorção (Cannon & Kirk 2007; Huhndorf et al. 2004; Wagner & Fischer 2002).

São encontrados nos mais diferentes habitats, responsáveis por diversos serviços ecossistêmicos, tal como degradar a matéria orgânica, atuando na ciclagem de nutrientes e, portanto, sendo fundamentais para manutenção da vida na biosfera. Podem ainda ser simbiotes, fazendo associações com outros grupos que vão desde artrópodes a seres humanos, plantas a outros fungos (Mueller et al. 2004; Webster & Weber 2007; Moore et al. 2011).

Além disso, os fungos são organismos de importância econômica, seja como alimento (o que inclui os processos de fermentação de pães, queijos e bebidas alcoólicas), medicinal (produção de antibióticos, como a Penicilina), industrial e agrícola (biorremediação, fungicidas e biopesticidas) (Esposito & Azevedo 2010; Moore et al. 2011).

2.HYMENOGHAETACEAE Donk, A FAMÍLIA –“Diz-Me Com Quem Andas E Direi Quem És”.

Hymenochaetaceae Donk. (Fiassont & Niemelä 1984; Larsson et al. 2006) pertence a um agrupamento artificial que reúne táxons com himenóforo poróide, cujos fungos que produzem basidiomas, que nada mais são que estruturas reprodutivas macroscópicas, em que o himênio, camada de células que produzem esporos, recobre o interior dos tubos e sua superfície externa se apresentana forma de poros (Ryvarden 1991), mas há também táxons cujo himenóforo é liso, ou seja, o himênio não possui poros (Cannon & Kirk 2007). Estão classificados em Basidiomycota R.T. Moore, pertencendo a Agaricomycotina Doweld, e Hymenochaetales Oberw. (Hibbett et al. 2007).

A família reúne fungos caracterizados por conter estirilpirenos, autapomorfia (caráter derivado que é exclusivo de um único táxon terminal) que lhes conferem coloração marrom e consequente escurecimento permanente das hifas quando em contato com KOH (reação xantocróica), pela presença de hifas generativas com septos simples, pela presença ou ausência de setas (estruturais estéreis) e por causar podridão branca na

madeira, degradando a lignina, celulose e hemicelulose (Cannon & Kirk 2007; Huhndorf et al. 2004; Wagner & Fischer 2002).

3. PHELLINUSs.I. – “*Adorno parasita de árvore abandonada*”
(C.A.T.O.)

Phellinus Quéél. representa, em seu sentido amplo, um dos grandes grupos de Hymenochaetaceae com distribuição de espécies parasitas e saprófitas (Fischer & Binder, 2004). Historicamente, os gêneros *Phellinus* e *Inonotus* P. Karst foram reconhecidos como os mais abrangentes em Hymenochaetaceae e, por longo tempo, muitos autores consideraram o mitismo (tipo de sistema hifal) e a sazonalidade dos basidiomas, como principais características que distinguiam esses dois grupos e, acabaram por considerar muitos gêneros descritos no século XX como sinônimos desses dois táxons (Cunningham, 1947; Larsen & Cobb-Poullé 1990; Lowe, 1957; Reid, 1963; Ryvarde, 2004; Wright & Blumenfeld 1984). Ou seja, fungos com basidioma perene e sistema hifal dimítico foram colocados em *Phellinus* enquanto que as espécies com sistema de hifas monomítico e basidioma anual foram identificados como *Inonotus* (Fiasson & Niemelä 1984; Corner, 1991; Wagner & Fischer 2001), o que

levou à dois grandes agrupamentos com espécies de variadas características morfológicas, totalmente artificiais (Corner, 1991; Fiasson & Niemelä 1984; Ryvardeen, 1991; Wagner & Fischer 2001).

Em dado momento, essas características começaram a ser questionadas (Corner 1991; Dai 1999; Fiasson & Niemelä 1984; Hansen & Knudsen 1997; Jahn 1981) e *Phellinussensu lato* hoje é considerado um grupo polifilético, não-natural, que apresenta outros vários agrupamentos menores, monofiléticos, representados até por alguns dos gêneros anteriormente sinonimizados (Fiasson & Niemelä, 1984; Fischer, 1996; Hansen & Knudsen, 1997; Wagner & Fischer, 2001, 2002).

4. DE PHELLINUS A PHELLINOTUS - *A taxonomia e a interpretação das entidades que habitam o planeta (J.S.F.)*

Por volta de 1950, Alcides Teixeira, que dedicava seus estudos micológicos especialmente à Hymenochaetaceae, numa saída de campo no Bosque dos Jequitibás em Campinas, São Paulo, coletou um fungo, que foi descrito por ele como *Phellinus piptadeniae* Teixeira. Em seus trabalhos, Teixeira o descreveu

como parasita especialista de *Piptadenia communis* Benth. (Fabaceae), sinônimo de *Piptadenia gonoacantha*, (Mart.) J.F.Macbr.conhecido como pau-jacaré, uma espécie vegetal comum e fácil de ser reconhecida na Mata Atlântica e em parte do Cerrado (Carvalho, 2004).

No protólogo, além da especificidade de *P. piptadeniae* com o pau jacaré, fica mencionado que a espécie deveria acompanhar a distribuição geográfica de seu hospedeiro, naturalmente encontrado em Florestas ombrófilas densas, nas formações de terras baixas, na submontana e na floresta estacional semidecidual (Klein,1980; Roderjan & Kuniyoshi,1998). Em outras palavras, Teixeira acreditava que a abrangência geográfica de *P. piptadeniae* estaria relacionada à distribuição geográfica do seu hospedeiro, mesmo que ele, Teixeira, só tenha estudado materiais coletados em São Paulo (Teixeira 1950).

Anos mais tarde, já no século XXI, Drechsler-Santos et al., (2010), expandiram a distribuição de *P. piptadeniae* para o domínio da Caatinga, tendo como hospedeiros recorrentes diferentes espécies de *Piptadenia* entre outros gêneros de Fabaceae. Em 2015, Salvador-Montoya e colaboradores registraram a ocorrência do táxon nas florestas tropicais

sazonalmente secas do Noroeste do Peru, em hospedeiros de leguminosas distintos (*Libidibia glabrata*Kunth e *Pithecellobium excelsum*Kunth) e confirmam, a ocorrência da espécie para Mata Atlântica do estado de Santa Catarina, também em *Piptadenia gonoachanta*, registrando sua ocorrência para o Sul do Brasil (Salvador-Montoya, 2014).

Até aqui é possível perceber que o táxon sofreu desde 1950 uma significativa ampliação de sua distribuição, mas a questão é que *Phellinus piptadeniae*, morfologicamente, destoa do conceito genérico para *Phellinus*.s.

Enquanto o conceito de *Phellinus*.s. é caracterizado micro- morfologicamente por apresentar sistema hifal dimítico (hifas generativas e esqueléticas), setas himeniais e basidiósporos hialinos a amarelo pálido (Wagner & Fischer 2002), *Phellinus piptadeniae* possui basidiósporos ovalados, de paredes espessas, o sistema hifal é dimítico nos tubos e monomítico no contexto e as setas são ausentes, e a macro morfologia se caracteriza por basidiomas aplanados a tríquetosos ou unglados, com superfície do píleo concentricamente sulcada, glabra, marrom escuro a enegrecido, com rachaduras radiais que formam rimosidades, à medida que os basidiomas se tornam senescente; o contexto

apresenta uma linha negra notória na parte superior, os tubos são estratificados e a superfície abhimental poróide possui de 4-5 poros/mm (Teixeira 1950; Ryvardeen 2004; Salvador-Montoya et al. 2015; Drechsler-Santos et al. 2016). Na Figura 1 são apresentadas algumas dessas características.

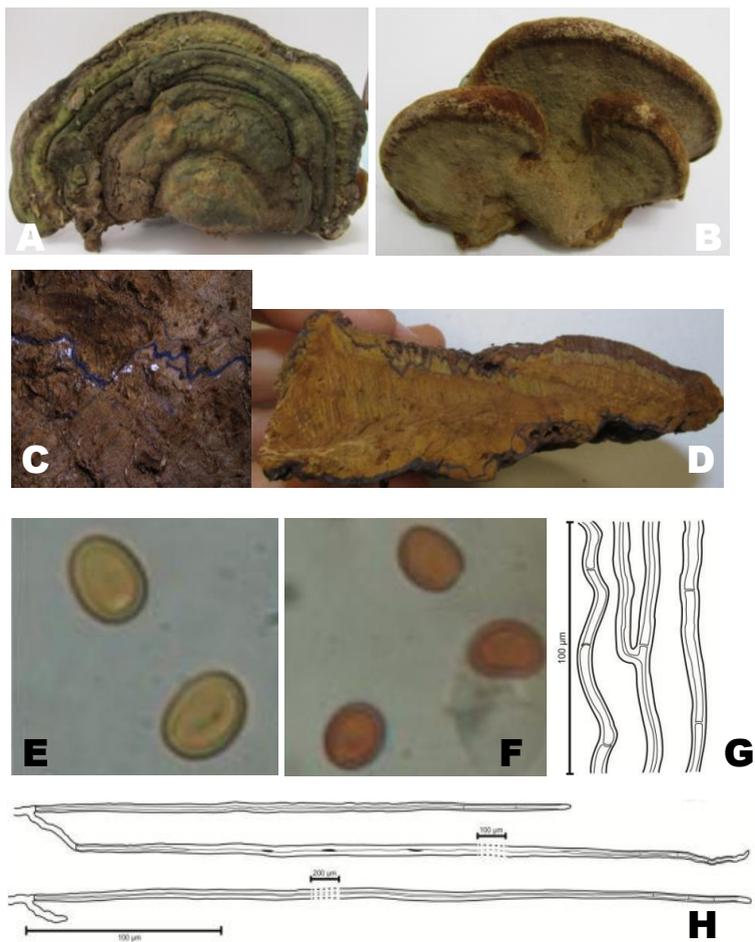


Figura 1: Caracteres morfológicos de *Phellinotus piptadeniae*. Características Macromorfológicas (a) superfície superior do píleo; (b) himenóforo (parte inferior do Píleo); (c) detalhe da linha negra do contexto; (d) contexto e tubos; Características Microscópicas (e) esporo em água. (f) esporo em KOH3% (reação xantocróica). (g) Esquemas das hifas generativas; (h) esquemas das hifas esqueléticas. Fonte: Salvador-Montoya et al. (2015).

Porém, os espécimes coletados nas florestas secas do Peru diferem, sobretudo, no tamanho dos basidiósporos quando comparados com aqueles materiais coletados nas demais localidades ($5.5-6 \times 4-4.5 \mu\text{m}$ e $5-5.5 \times 3.5-4 \mu\text{m}$, respectivamente) (Salvador-Montoya et al. 2015).

Diante dessa conjuntura, Salvador-Montoya et al. (2015), apresenta as seguintes hipóteses: *P. piptadeniae* corresponde a um complexo de espécies com pelo menos três espécies distintas (espécie da Caatinga, espécie do Peru e espécie da Mata Atlântica), ou seja, organismos morfológicamente muito semelhantes, mas com significativas diferenças genéticas, especializados em seus respectivos hospedeiros com distribuições restritas a diferentes áreas, ou *P. piptadeniae* corresponde a uma

única espécie com distribuição geográfica ampla e disjunta ao longo do bioma das Florestas Tropicais Sazonalmente Secas da América do Sul (Salvador-Montoya et al. 2015).

Os mesmos autores, Salvador-Montoya et al., (2015), *a posteriori*, (dados não publicados), a partir de análises filogenéticas da região rDNA ITS, indicam que o caminho mais parcimonioso seria a primeira possibilidade, de que há, ao menos, três linhagens independentes para o que chamamos de *Phellinus piptadeniae*.

Drechsler-Santos et al. (2016), propõe então o gênero *Phellinotus*. A circunscrição desse novo gênero para Hymenochaetaceae reposiciona a espécie de *Phellinus* para *Phellinotus* (comb. nov.), mesmo que a hipótese filogenética tenha sido apresentada apenas a partir de espécimes oriundos da Caatinga (Drechsler-Santos et al. 2016).

**5. PHELLINOTUS PIPTADENIAE: HISTÓRIA NATURAL
NO CONTEXTO DA DIVERSIDADE** - *O meu fim evidente era
atar as duas pontas da vida (M.A.)*

A resolução de complexos taxonômicos é tão difícil quanto à percepção de que existe uma especiação em curso (Theodoro, 2010). Espécie, em biologia, é um termo difícil de definir. Existem diferentes conceitos aplicados aos diferentes organismos que conhecemos. Ernest Mayr, biólogo evolucionista, em 1963, apresenta o conceito de que espécie é uma linhagem única proveniente de um ancestral comum, que possui uma identidade genética e constitui uma unidade reprodutiva e ecológica e que tem suas próprias tendências evolutivas. A primeira vista, parece uma definição válida, mas como aplicá-la para reconhecer espécie, ou então, para diferenciar espécies muito parecidas? A aplicação unicamente de critérios morfológicos seria de valor limitado, especialmente quando o táxon exibe ampla distribuição, tanto em termos de origem geográfica como de nicho ecológico (Menezes, 2006).

Considerar espécie como grupo de indivíduos intercruzantes que originam descendentes férteis (Conceito

Biológico) é um conceito também difundido e usado para os mais diversos grupos de organismos. Mas, não é aplicável para populações sexuadas após o isolamento geográfico (alopatria), uma vez que, outras características podem divergir antes da perda do potencial de intercruzamento (as espécies já estão isoladas e não há seleção para a formação de barreiras ao fluxo gênico) podendo levar a um conflito entre fluxo gênico real e fluxo gênico potencial (Taylor et al. 2006).

E se definirmos espécie como um grupo de indivíduos que ocupam o mesmo nicho ecológico? (E se entende nicho ecológico aqui como um conjunto de interações entre fatores bióticos e abióticos, bem como a sobrevivência dos organismos sob diferentes condições e recursos oferecidos pelo ambiente. Esse conceito (chamado de conceito ecológico) esbarra no fato de que o nicho ecológico possui infinitas dimensões, o que torna difícil delimitar o que é nicho, especialmente quando envolve interações bioquímicas com o substrato, seja ele saprobiótico ou simbiote (Theodoro, 2010).

Para a filogenética, espécie é o menor grupo de organismos derivado de um único ancestral comum (monofiletismo). Os membros de uma espécie compartilham

apomorfias (características derivadas ou novidades evolutivas) que não existem em outras espécies. O reconhecimento filogenético de espécie detecta divergência genética no genoma e pode determinar assim quais populações estão isoladas reprodutivamente pela concordância da árvore genealógica de seus genes. Nos deparamos aqui com o fato de que uma árvore de genes/locos não reflete de forma completa a história da espécie (Robe, 2004).

O fato é que por mais que múltiplos conceitos de espécie existam, sendo que os que foram aqui discutidos são os mais operacionais para os biólogos, é preciso que haja um diálogo de forma integrativa, já que a perspectiva unidirecional não congrega todas as possibilidades. (Fischer & Binder 2004).

Mas tão importante quanto refletir a história evolutiva dos grupos e reuni-los com base no grau de parentesco, assim como conhecer a diversidade das espécies, no sentido de tentar responder a pergunta: Quantas espécies existem? É também importante investigar as possíveis causas dessa diversidade.

Com esse argumento vou tentar responder à última pergunta desse tópico: Por que *Phellinotus piptadenaie*(Teixeira) Drechsler-Santos & Robledo?

O táxon pode vir a ser um bom modelo para estudos de microevolução porque: *i*) representa uma linhagem em processo de especiação. *ii*) Tem associação espécie-específica com uma árvore de Mata Atlântica. *iii*) O entendimento da diversidade genética de macrofungos e, consequentes acessos ao seu patrimônio genético, podem contribuir para a conservação.

6. GENÉTICA DE POPULAÇÕES – “*infindáveis formas (...)* evoluíram ou estão evoluindo”.(C.D.)

O começo dessa conversa precisa de uma volta no tempo: meados dos anos 30. Nessa época, Ronald Fisher (1930), estatístico e biólogo evolutivo inglês e Sewall Wright (1931), geneticista estadunidense, publicam a síntese de genética de populações, revelando a divergência de opiniões sobre o efeito da estrutura da população na dinâmica da evolução por seleção natural, ampliando o interesse pela estrutura genética de populações naturais, interesse que já era crescente.

No início daquele século, mais precisamente em 1908, dois pesquisadores, não tão ligados à ciência biológica, descobriram o princípio relativo às frequências dos alelos em uma população, o famoso: *Equilíbrio De Hardy-Weinberg*, teorema que, além de levar o nome de seus pensadores, o matemático inglês, G.H. Hardy, e o físico alemão, W. Weinberg permitiu estudar a frequência de certos genes e alelos em uma determinada população (e se entende alelo como pedaços homólogos do DNA, formas alternativas de um mesmo gene que afetam a mesma característica de modo diferente) (Carvalho, 1987).

Mas o que estuda a genética de populações? Estuda as frequências alélicas e genotípicas nas populações e as forças capazes de alterar essas frequências ao longo das gerações, interferindo na distribuição não aleatória dos alelos (Hanrick, 1992). E essas forças são: seleção natural, que pode alterar as frequências dos alelos rapidamente, mutação e recombinação gênica que, geram a variação genética, padrões de cruzamento e fluxo gênico que modelam a organização hierárquica da variação genética, e o tamanho efetivo populacional, que regula o processo da deriva genética (Brand et al. 1993).

Dessa maneira, o estudo genético de populações tem como um de seus objetivos entender a estrutura genética, ou seja, descrever quanto de variação genética existe dentro e entre populações, o quão heterogêneo é a distribuição dos genótipos, condições que são determinadas pela história evolutiva e pelo potencial de alteração dos organismos (Brown, 1978).

Essa variação é condição fundamental para que haja evolução; a manutenção da diversidade genética é matéria prima para a sobrevivência das espécies, já que a seleção natural atua nas populações em função da adaptação ao ambiente, direcionando para a variação entre populações e, no fim do processo, para a variação entre as espécies (Torggler et al., 1995). Quanto maior a variabilidade genética existente na população, maior sua chance de perpetuação. Ora, sendo assim, a descrição e distribuição da variação genética é a base para conservação das espécies (Yeoh et al. 1996).

Cavallari,2004, sugere que os padrões de distribuição e estruturação de variabilidade genética nas populações são definidos por interações entre fatores ecológicos e evolutivos (Cavallari, 2004). Tamanho da população, modo de reprodução (assexuada ou sexuada), sistema de reprodução, fluxo gênico e a

forma como indivíduos da espécie interagem com o ambiente e com outros organismos influenciam na distribuição da variação genética entre e dentro das populações (Pessoa-Filho, 2008). Para populações grandes, com sistema misto de reprodução e mecanismos de dispersão, existe alta variação genética dentro e baixa entre as populações. Em espécies com populações pequenas, com autofecundação e limitada taxa de dispersão, se espera uma baixa variabilidade dentro da população e alta entre populações (Loveles & Hamrick, 1984).

Além de conhecer a constituição genética dos indivíduos, é necessário determinar como os genes são transmitidos às próximas gerações. A constituição genética da população em relação aos alelos, que são transmitidos a cada geração, pode ser descrita pelas frequências alélicas (Falconer & Mackay, 1996). A frequência alélica é a frequência de um alelo particular em uma população e pode ser estimada contando o número de vezes em que é encontrado dividido pelo número total de alelos daquele loco na população (Nei, 1987).

Diante do exposto, ainda existe uma questão que é um dos problemas que os micólogos enfrentam: como definir população para macro fungos? Seria um grupo de organismos que trocam

material genético entre si? Bom, essa definição se encaixa para certos grupos, mas aqui, não nos é suficiente, pois nos deparamos com mais um inquietude: Como definir indivíduos em macrofungos?

Por isso, para entender a estrutura genética (frequência alélica no tempo e espaço) em macrofungos necessitamos ao mesmo tempo definir a distribuição espacial dos organismos (determinada pelo sistema de reprodução e sistema de dispersão), suas limitações físicas (Futuyma, 1992), e a genética temporal, que se refere às gerações e suas subdivisões (Brown, 1978).

Uma das especificidades importantes do processo evolutivo é a inseparabilidade de seus dois momentos: o processo e o seu produto. Entender a diversidade genética em macrofungos, organismos chave para os ecossistemas florestais, em virtude de seus diversos serviços ecossistêmicos (como degradadores da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, por exemplo), é fundamental para sustentabilidade e estabilidade dos ecossistemas.

7. MARCADORES MOLECULARES- *Vou mostrando como sou e vou sendo como posso(M.M.)*

Marcadores genéticos são características capazes de diferenciar os indivíduos. Quando o pesquisador se preocupa com as características morfológicas, ele lança seu olhar para marcadores morfológicos, os fenótipos, que são resultado da interação dos fatores epigenéticos (modificações herdáveis sem que haja mudança na sequência de DNA) e o genótipo mais os fatores ambientais; são características visíveis, observáveis do organismo. Quando o interesse se refere às características presentes ao nível molecular, o pesquisador então se preocupa com os marcadores (moleculares), mais especificamente os polimorfismos (diferenças na sequência de nucleotídeos) detectados na sequência de DNA. Ou seja, esse marcador é definido como um caráter molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA observado diretamente no genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Se compararmos esses dois tipos de marcadores, os moleculares têm algumas vantagens frente aos morfológicos. Em contraste com caracteres morfológicos, os marcadores moleculares possuem neutralidade fenotípica, não estão sob

influências ambientais, portanto, geralmente são herdados de forma codominante e podem ser detectados tanto em organismos jovens como em adultos (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1988a).

A escolha dos marcadores moleculares deve ir ao encontro de características desejáveis que esse marcador possa oferecer como, por exemplo, a presença de alto polimorfismo (sem saturação ou homoplasias oriundas de excessos de polimorfismo), reprodutibilidade, ampla distribuição através do genoma e facilidade de mensurar (Souza, 2014).

O Polimorfismo de DNA entre indivíduos, o que move o interesse de estudos com os marcadores moleculares, possui diferentes origens: pode ser devido a variações de comprimento geradas por inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos em uma sequência de DNA, os chamados *INDELS* ou, a uma variação na sequência de DNA que afeta somente uma das bases nitrogenadas (adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G)) na sequência do genoma, e esse tipo de variação recebe o nome de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) que devem ocorrer em no mínimo 1% de determinada população (Griffiths, 2006). Uma vez identificados *in silico*, os marcadores precisam ser

convertidos em pares de *primers* específicos que amplifiquem apenas a região que contém a mutação, para posterior validação e mapeamento.

Porém, usar um único marcador pode apresentar limitações; trazendo a discussão para a micologia, diversos grupos de fungos podem apresentar diferentes níveis de variação interespecífica, intraespecífica ou até intra-indivíduo, o que pode gerar uma super ou sub estimação da diversidade (Rodriguez, 2003).

Existem diversos marcadores moleculares, que nos permitem analisar genes específicos, aplicados a estudos biológicos, ecológicos e sobre diversidade. Em trabalhos no contexto micológico, marcadores como ITS, LSU, TEF1- α são comumente utilizados (Alvarez & Wendel, 2003; Song, et al. 2017), especialmente porque são unidades herdáveis multicópia, conservadas (com baixa taxa de mutação) capazes de revelar polimorfismos. Entretanto, não há um marcador único que seja totalmente eficiente e capaz de revelar a estrutura da diversidade genética, daí, diante disso se faz necessário utilizar combinações

de marcadores. Para o presente estudo, fiz a combinação de cinco marcadores, a saber, ITS, ATP6, RPB2, EF1- α e β -tub.

Um dos principais marcadores utilizados na genética de fungos é o DNA ribossomal (DNAr), sendo considerado a região *Barcoding*, sistema de identificação e descobrimento de espécies utilizando um pequeno trecho de DNA de uma região padronizada do genoma (Schoch et al. 2012). Essa unidade possui três regiões gênicas (18S, 5.8S e 28S – Figura 2) e duas regiões espaçadoras (ITS e IGS) e possui sequencias altamente conservadas (Baldwin et al 1995; Appel; Gordon, 1996; O'donnell & Cigelnik, 1997). A região ITS (*Internal transcribed spacer*) é o espaçador situado entre a subunidade menor e a subunidade maior do ribossomo revela a diversidade genética entre espécies estreitamente relacionadas, pois por ser conservada e multicópia, se torna válida especialmente para variações intra- genérica, revelando informações específicas (Bruns et al. 1991).

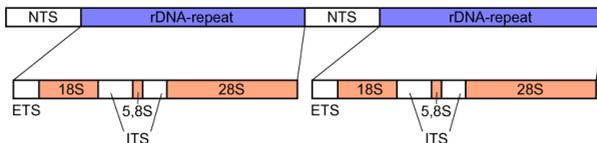


Figura 2: Mapa da região ITS do rDNA (Torres-Machorro, 2010) utilizado como um das regiões gênicas no presente trabalho.

A RNA-polimerase, é a enzima que cataliza a transcrição de DNA. Possui cerca de 10 a 12 subunidades. A segunda subunidade maior é a RPB2, que mantém contato com o sítio ativo da enzima entre a fita molde de DNA e o RNA mensageiro recém-sintetizado (Bandon, 2006; Malkus et al 2006). Esse marcador molecular, dessa região, é variável e de rápida evolução e tem se mostrado útil para determinação específica em nível molecular (Figura 3).

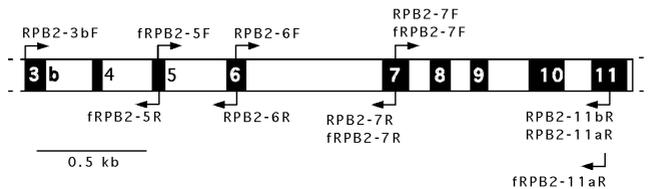


Figura 3: Mapa da região gênica para o marcador RPB2, utilizado como um dos marcadores e as regiões de ancoragem dos primers.

Os marcadores mitocondriais acessam a informação contida no DNA mitocondrial, presente na organela responsável pela respiração celular, a mitocôndria. É uma molécula circular, que possui tamanho, em pares de bases, variáveis nos diferentes

grupos de eucariotos e carrega herança uniparental (Brown et al. 1979).

As diferenças nos tamanhos e na capacidade de código dos DNAs mitocondriais dos organismos indicam que durante a evolução houve uma provável movimentação do DNA entre a mitocôndria e o núcleo; em fungos, existe a presença de *íntrons*, partes da molécula que não são codificantes e sinais de recombinação e é uma molécula (em leveduras) que tem tamanho aproximado de 78.000 pb (Pakendorf, 2005). O marcador escolhido para o DNA mitocondrial (ATP6) é o do gene para ATP-sintase (ATP6) que, além da síntese de ATP pra metabolismo energético, ainda tem sob sua responsabilidade a manutenção da integridade da molécula de DNA mitocondrial (Figura 4).

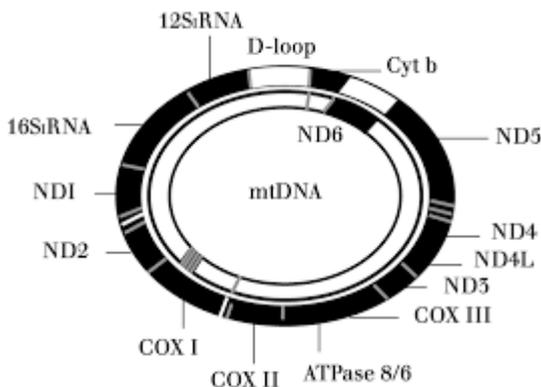


Figura 4: Esquema do mtDNA com suas respectivas regiões genéticas, incluindo a região ATP6, utilizada no presente trabalho.

Um marcador que é pouco usado na micologia é o marcador para o gene da β -tubulina. Os microtúbulos são proteínas essenciais cuja principal função é estrutural. Fazem parte do citoesqueleto e participam diretamente da divisão celular e da migração e posicionamento nuclear. Microtúbulos são tubos longos, formados por moléculas de tubulina (filamento proteico) em formato globular: a α -tubulina e β -tubulina (Stotz & Long, 1999, Postingl et al. 1981). A β -tubulina, tem despertado interesse devido à alta conservação de sua sequência. Genes que codificam β -tubulina em fungos geralmente variam entre filós, mas são altamente conservados em espécies relacionadas (Stefan et al 2004; Kawchuk et al. 2002) (Figura 5).

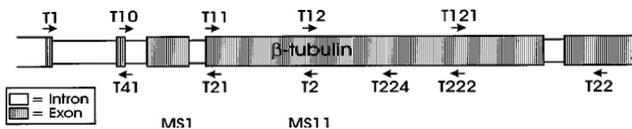


Figura 5: Mapa da região gênica β -tubulina, marcador molecular utilizado no presente trabalho.

O TEF 1 α ou EF-1 α , é fator de alongamento da tradução, gene membro da família das GTPase (enzimas que se ligam e hidrolizam o GTP, molécula de transporte energético), de estrutura conservada presente nos eucariotos, essencial durante a fase de alongamento da síntese de proteínas (Baldauf et al. 1993; Ichi & Inoue, 1995; Keeling et al. 2004; O'donnell et al. 1998). Por apresentar regiões conservadas e com elevada atividade promotora é considerado um gene *housekeeping* utilizado em estudos filogenéticos e em diferenciações de espécies em eucarióticos (Roger et al. 1999; Lievens et al. 2008) e possui alto grau de polimorfismo entre espécies estreitamente relacionadas (Sampietro et al. 2010) (Figura 6).

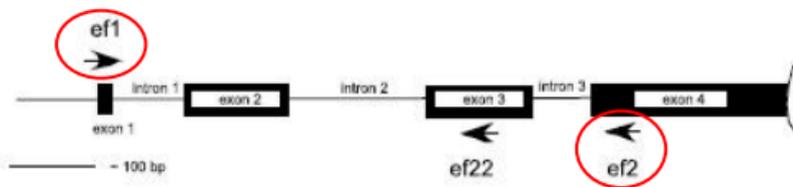


Figura 6: Mapa da região EF1 e EF2 (Geiser et al.2004), marcador molecular utilizado no presente trabalho.

8. O HOSPEDEIRO - *Da estrada que não cabe onde termina (M.G.)*

8.1 A Planta e a Mata Atlântica:

Tão importante quanto entender quem é o fungo, em amplo contexto, é entender seu hospedeiro já que existe uma íntima relação entre os organismos. Quem abriga *Phellinotus piptadenae* em seu interior e o carrega sobre si é uma espécie arbórea chamada *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F.Macbr., já citada nesse texto. A espécie ocorre, segundo Lorenzi (1992), principalmente na Floresta Pluvial da encosta Atlântica. Apresenta distribuição que vai de áreas ao nível do mar, nos litorais das regiões Sul e Sudeste, até áreas de altitude na região serrana de Minas Gerais (Figura 7).

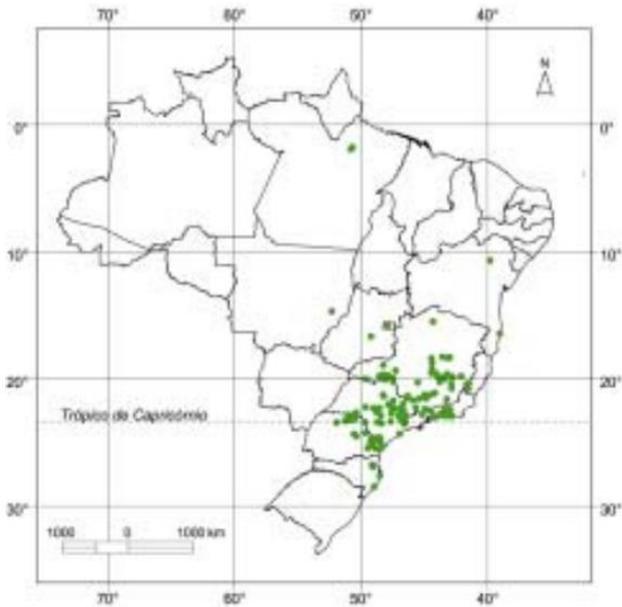


Figura 7: Distribuição geográfica de ocorrência natural do Pau Jacaré – *Piptadenia gonoachanta*(Mart.) J.F.Macbr. Fonte: EMBRAPA, 2004.

Mas aqui, vale um resgate para que se possa contextualizar um pouco da história da Mata Atlântica, domínio fitogeográfico em que as personagens dessa história coexistem (Salvador-Montoya et al. 2015).

No passado, início do século XVI, a Mata Atlântica abrangia uma área de 1.315.460 km², distribuídos dos estados do Rio Grande do Sul ao Rio Grande do Norte. Em razão da exploração dos recursos desse ecossistema e intensa ação antrópica, a cobertura vegetal nativa de suas florestas foi reduzida a fragmentos pequenos e desconectados (Putz et al. 2011). Da cobertura original, restam 7% de fragmentos acima de 100 hectares que ainda estão conservados (SOS Mata Atlântica, 2015).

Mesmo com quase uma completa redução, a Mata Atlântica representa uma das fito-fisionomias mais ricas em biodiversidade, sendo decretada Reserva da Biosfera pela UNESCO, Patrimônio Nacional pela Constituição Federal de 1988 e considerada um *hotspot* mundial para a conservação em virtude da ameaça que sua biodiversidade está sujeita.

A composição da vegetação na Mata Atlântica é formada por um mosaico de formações florestais definidas como Floresta Ombrófila Densa, Ombrófila Mista, Estacional Semidecidual, Estacional Decidual, Ombrófila Aberta e alguns ecossistemas associados com os campos de altitude, manguezais e restingas (Rodrigues et al. 2009).

Segundo Caruso (1990), a Mata Atlântica representava 74% da cobertura vegetal da Ilha de Santa Catarina, (313 km²), porém, até o ano de 1978, 87,8% de sua área original foi destruída, restando apenas 12,7% nas regiões mais inacessíveis das encostas. Hoje, a vegetação se distribuiu que exclusivamente de forma fragmentada nas encostas dos morros, em diferentes estágios de regeneração.

Diversos estudos destacam os impactos negativos da fragmentação dos remanescentes da cobertura vegetal original para a manutenção da diversidade genética (Young et al. 2000; Laurence & Cochrane, 2001; Tabarelli et al. 2004), como o prejuízo ao fluxo gênico entre os ambientes (Smith-Ramírez et al 2007) e a redução da variabilidade genética dessas populações (Cascante et al. 2002), além do fato de que o sucesso reprodutivo, a taxa de crescimento e estrutura demográfica das espécies também podem ser muito prejudicados devido aos processos de fragmentação (Rodrigues & Nascimento, 2006; Vidal, 2007).

As populações dessas áreas estão sujeitas a um aumento na taxa de auto fecundação e de cruzamento entre indivíduos aparentados elevando a endogamia (Hanson et al. 2008). A endogamia pode reduzir a heterozigosidade ea adaptabilidade das

espécies, aumentando a probabilidade de extinção dessas populações (Matthies et al. 2004; Reed, 2005).Ao encontro desse fato está o trabalho realizado por Bajay, (2010), que investigou a estrutura a diversidade genética de *P. gonoacantha*; os dados das coletas revelam que existe ausência de fluxo gênico entre as localidades em que houve amostragem, mas os genótipos analisados estão submetidos a forte endogamia, visto que, dentre outros aspectos, a área amostrada está sujeita a intensa fragmentação.

Mas voltando, de fato, a espécie botânica, o gênero *Piptadenia* (Mimosoideae-Fabaceae) tem aproximadamente 80 espécies tropicais e subtropicais da América (Lewis, 1987). Dentre essas espécies, encontra-se a *Piptadenia gonoacantha*, conhecida como pau-jacaré, angico-branco, monjolo, caniveteiro, casco-de-jacaré, camboeteiro, serreiro, icarapé, jacarezeiro e monjoleiro (Carvalho, 2004).Essa planta é uma espécie arbórea, semicaducifólia, heliófita, com 10-20 m de altura e 30-50 cm de diâmetro à altura do peito (DAP), podendo atingir até 30 m de altura e 90 cm de DAP quando adulta, tipicamente gregária, com maior densidade de indivíduos nas clareiras (Carvalho, 2004). Possui rápido crescimento, sendo classificada de acordo com o

estágio sucessional como pioneira ou secundária inicial (Carvalho, 2004; Lorenzi, 2002) ou clímax exigente em luz (Werneck et al. 2000).

O tronco da árvore apresenta cristas aculeadas (Lorenzi, 1992). A casca tem espessura máxima de cinco mm, sendo que a casca externa possui cristas lineares longitudinais que se interligam por outras menores transversais, de textura áspera nas plantas jovens e com rachaduras nas plantas adultas. (Carvalho, 2004) (Figura 8).



Figura 8: Pau Jacaré. Figura (a) Destaque para os acúleos; (b) Detalhe para a filotaxia - folhas alternas, compostas bipinadas (Foto: Raissa Nagaoka); (c) Detalhe dos frutos (Fonte: EMBRAPA).

8.2 A Geologia, o histórico do uso da Ilha de Santa Catarina, e a relação com a distribuição do Pau Jacaré:

i) Geologia da Ilha de Santa Catarina – Uma volta no tempo

Para Rocha, 1983, a geomorfologia, cujo objetivo é a gênese e a evolução das formas do relevo, guarda uma estrita relação com os processos de formação do solo (Rocha, 1983).

Diante desse argumento, há a necessidade de se fazer um breve histórico da geomorfologia da Ilha de Santa Catarina, para alinhar o pensamento indo ao encontro da formação dos solos, que é o que mais nos interessa aqui, pois determinados tipos de solo, explicam, por um lado, a ocorrência de *Piptadenia gonoacantha* nas localidades em que foram amostradas.

A Ilha pode ser classificada em dois domínios geomorfológicos: Terras altas e Terras Baixas (GERCO, 2010). O Domínio geomorfológico das Terras Altas é constituído por rochas do Embasamento Cristalino (conjunto de rochas ígneas ou metamórficas). Já o domínio geomorfológico das Terras Baixas é representado por terrenos de baixa amplitude altimétrica, geomorfológicamente identificado por praias, planícies de maré, cordões litorâneos, dunas, terraços marinhos e fluviais, e segundo

Herrmann e Rosa, 1991, onde se identifica acúmulo de sedimentos (Herrman & Rosa, 1991).

Existe uma grande diversidade de solos associados a esses dois domínios geomorfológicos. Para nosso estudo aqui dois são importantes: os *Solos Argissolos Vermelho-Amarelos e Argissolos Vermelhos*, associados ao Domínio Geomorfológico das Terras Altas, encontrados nas encostas de morros e colinas e o *Neossolo Quartzarênico*, associados ao Domínio das Terras Baixas, encontrado nas planícies e nos depósitos eólicos. Para a Ilha, esse solo é encontrado nas proximidades do rio Papaquara, praia Brava, São João do Rio Vermelho e limite leste da lagoa da Conceição; há ocorrência desde a praia Mole até a praia da Armação, em faixas por vezes descontínuas, a oeste em Naufragados, ponta da Tapera e do Caiacanga-Açu (Alencar, 2013).

Segundo a literatura (Carvalho, 2004; Gallão et al. 1998), o Pau Jacaré ocorre naturalmente em solos variados, incluindo solo de origem calcária e solos com textura que varia de areno-argilosa a argilosa, ou seja, sua distribuição atual, especialmente nas áreas de maior ocorrência (Morro da Lagoa e Encosta de Naufragados) acompanha a distribuição.

Mas a característica do solo é apenas um dos vieses possíveis para tentar explicar a distribuição da espécie vegetal, é preciso também olhar sob a perspectiva do uso da Ilha pelas comunidades.

ii) O Histórico do Uso da Ilha e de *Piptadenia gonoacantha*, o Pau Jacaré

De acordo com Caruso (1990) a cobertura vegetal da Ilha começou a sofrer exploração efetiva após o estabelecimento das colônias de origem açoriana, no século XVIII, nos idos de 1750. A partir desta época, os diversos tipos de exploração da madeira (lenha, construção naval, civil, de móveis e para exportação) se intensificaram (Caruso, 1990). A mesma autora sugere, entretanto, que a agricultura foi o principal fator do desmatamento. Foram os desmatamentos realizados para abrirem espaço para a agricultura os principais responsáveis pelo impacto sobre a vegetação, já que o colono abria as clareiras a fogo e machado, deixando o solo sem cobertura vegetal. A baixa fertilidade dos solos da Ilha e a grande declividade dos terrenos, junto com essa prática de cultivo que não conserva a terra, contribuíram para que, à medida que o solo se esgotava, a fronteira agrícola fosse se movendo a novas áreas (seja para o

interior ou subindo as encostas) para dar lugar a novas roças (Caruso, 1990).

Mesmo as áreas remanescentes que não foram desmatadas totalmente, sofreram extração seletiva de árvores de valor econômico. Portanto, mesmo em áreas cuja agricultura não afetou significativamente, elas não apresentam mata primária típica, em função da exploração da madeira. Essas áreas remanescentes mais significativas estão localizadas nas partes mais altas das encostas, principalmente na região da Lagoa do Perí, Ribeirão da Ilha, Maciço da Costeira e Rio Tavares, ao sul, Costa da Lagoa, a leste, e Ratonés, no norte da Ilha.

Lelles, 1978, e Heringer, 1947, em seus estudos, chamam a atenção no sentido de que *Piptadenia gonoacantha* tem uso na construção civil, como fonte de lenha e carvão vegetal e biomassa para alimentação animal sendo, portanto, uma planta com potencial exploratório que pode ter sido amplamente utilizado pelos colonos (Lelles, 1978; Heringer, 1947).

Sendo assim, foram reunidas aqui possibilidades coerentes que nos ajudam a entender a atual distribuição do hospedeiro e

consequentemente a distribuição e ocorrência do fungo da forma em que foi encontrada.

Depois do exposto, são apresentadas algumas perguntas orientadoras, que serviram como linha mestra do presente trabalho:

- i) Os 500 anos de fragmentação da Mata Atlântica é tempo suficiente para uma significativa diferença genética entre os organismos coletados nas diferentes localidades amostradas?
- ii) É possível existir mais de uma população de *Phellinotus piptadeniae* na Ilha de Santa Catarina?
- iii) A estratégia utilizada para estudo da Diversidade Genética revela significativamente os polimorfismos?
- iv) O que a variação genética, caso ela exista, diz sobre a história da espécie?
- v) Qual a importância para a Conservação de *Piptadenia gonoacantha* e da Mata Atlântica e de *Phellinotus piptadeniae* relacionado ao estudo de genética de populações em macrofungos?

9. OBJETIVOS

9.1 Gerais:

Acessar as bases populacionais de uma espécie de fungo pertencente à Hymenochaetaceae, *Phellinotus piptadeniae*, parasita facultativo de *Piptadenia gonoacanthana* Ilha de Santa Catarina.

9.2 Específicos:

- a) Caracterizar a estrutura populacional e a variabilidade genética de *Phellinotus piptadeniae* na Ilha de Santa Catarina
- b) Quantificar e comparar, se houver, a variabilidade genética intra populacional e inter populacional.
- c) Relacionar a diversidade genética com a distribuição geográfica e fazer inferências sobre a dispersão, especiação e outros fatores evolutivos que afetam a distribuição da diversidade genética da espécie na área amostrada;

10. MATERIAL E MÉTODOS

10.1 Populações em estudo e estratégia de coleta

Foram amostradas sete localidades na Ilha de Santa Catarina totalizando 74 indivíduos. As populações amostradas e suas respectivas regiões de coleta foram definidas com base na localização das populações de *Piptadeniae gonoacantha*, hospedeiro do fungo objeto desse estudo, disponíveis em listas virtuais de acervos de herbário (Splink; <http://www.splink.org.br/index?lang=pt>) e citações na literatura (Tabela 1).

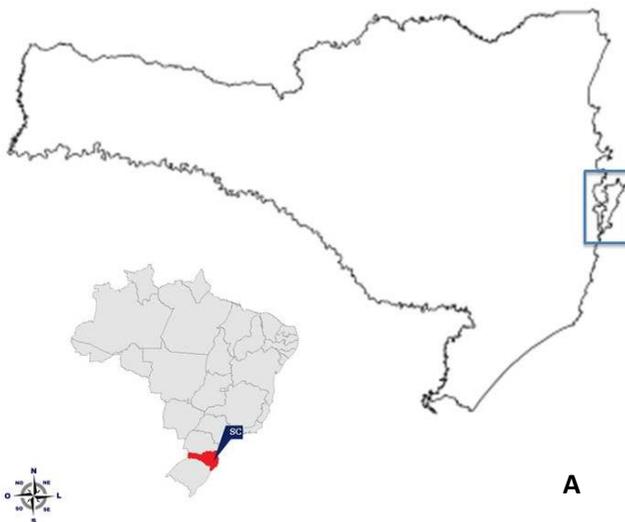
As localidades estão distribuídas entre as regiões norte, sul e centro da Ilha, distantes, em linha reta, 31.8 km em seus extremos. (Figura 9).

Tabela 1. Relação de espécimes estudados de *Phellinotus iptadeniae* coletados em *Piptadenia gonoacantha*, com informações sobre número de Coletor, localidade, coordenadas geográficas dos Indivíduos coletados.

Número de Coletor	Coordenada		Altitude	Localidade na Ilha de SC
MF 059	27°35'56.82"S	48°30'38.40"O	28m	Parque do Córrego –Centro da Ilha
MF 060	27°35'57.08"S	48°30'36.01"O	33m	
MF 061	27°35'55.61"S	48°30'37.76"O	32m	
MF 062	27°35'55.12"S	48°30'38.06"O	28m	
MF 063	27°35'49.68"S	48°30'38.94"O	27m	
MF 064	27°35'49.03"S	48°30'37.83"O	17m	
MF 065	27°35'50.13"S	48°30'38.26"O	31m	
MF 072	27°36'06.96"S	48°28'28.70"O	27m	Canto da Lagoa – Centro da Ilha
MF 073	27°36'07.84"S	48°28'27.12"O	25m	
MF 074	27°36'08.00"S	48°28'25.96"O	20m	
MF 075	27°36'05.41"S	48°28'25.54"O	13m	
MF 081	27°36'05.47"S	48°28'22.51"O	20m	
MF 082	27°36'04.92"S	48°28'21.90"O	26m	
MF 083	27°36'04.39"S	48°28'23.64"O	15m	
MF 084	27°36'04.45"S	48°28'24.20"O	16m	
MF 085	27°36'04.36"S	48°28'23.51"O	15m	
MF 086	27°36'04.28"S	48°28'23.36"O	14m	
MF 087	27°36'04.30"S	48°28'23.14"O	15m	
MF 088	27°36'04.27"S	48°28'23.33"O	15m	
MF 089	27°36'07.15"S	48°28'22.08"O	25m	
MF 076	27°36'03.42"S	48°31'35.38"O	44m	Rua Rodolfo Manuel Bento – Centro da Ilha
MF 077	27°36'04.70"S	48°31'35.52"O	34m	
MF 078	27°36'02.99"S	48°31'38.33"O	78m	
MF 079	27°36'03.59"S	48°31'38.40"O	65m	
MF 080	27°36'04.91"S	48°31'37.64"O	46m	
MF 090	27°48'24.55"S	48°33'36.93"O	26m	
MF 091	27°47'52.06"S	48°33'49.20"O	47m	
MF 092	27°48'24.88"S	48°33'36.91"O	35m	

MF 093	27°48'23.31"S	48°33'37.52"O	51m	
MF 094	27°48'34.72"S	48°33'33.10"O	57m	
MF 095	27°48'39.47"S	48°33'33.39"O	23m	
MF 096	27°48'39.80"S	48°33'33.28"O	25m	
MF 097	27°48'40.49"S	48°33'32.93"O	25m	
MF 098	27°48'39.55"S	48°33'33.16"O	23m	
MF 099	27°48'40.61"S	48°33'32.67"O	22m	Naufragados – Sul da Ilha
MF 100	27°48'51.50"S	48°33'35.02"O	14m	
MF101	27°48'52.18"S	48°33'36.32"O	16m	
MF 102	27°48'51.53"S	48°33'34.73"O	39m	
MF 103	27°48'01.31"S	48°33'59.96"O	16m	
MF 104	27°48'01.98"S	48°33'00.16"O	13m	
MF 105	27°48'01.60"S	48°33'00.02"O	14m	
MF 106	27°48'02.85"S	48°33'00.43"O	17m	
MF 107	27°47'50.33"S	48°33'59.49"O	15m	
MF 108	27°47'48.53"S	48°33'46.71"O	25m	
MF 109	27°47'47.76"S	48°33'41.85"O	35m	
MF 110	27°47'48.67"S	48°33'45.86"O	41m	
MF 111	27°47'49.34"S	48°33'45.81"O	61m	
MF 112	27°47'51.03"S	48°33'48.64"O	42m	
MF114	27°35'43.98"S	48°29'24.54"O	47m	Base do Morro- Lagoa - Centro da Ilhada
MF 115	27°35'48.85"S	48°29'26.83"O	30m	
MF 116	27°35'43.76"S	48°29'27.06"O	32m	
MF 117	27°35'44.60"S	48°29'30.19"O	25m	
MF 118	27°35'43.81"S	48°29'30.98"O	27m	
MF 119	27°35'44.39"S	48°29'26.46"O	42m	
MF 120	27°35'50.56"S	48°28'47.17"O	196m	Morro da Lagoa – Centro da Ilha
MF 121	27°35'48.65"S	48°28'46.63"O	206m	
MF 122	27°35'33.10"S	48°28'39.06"O	267m	
MF 123	27°35'32.96"S	48°28'37.64"O	274m	
MF 124	27°35'12.02"S	48°28'41.49"O	269m	
MF 125	27°35'07.92"S	48°28'42.55"O	276m	

MF 126	7°31'25.82"S	48°28'32.26"O	50m	Ratones – Norte da Ilha
MF 127	7°31'27.01"S	48°28'30.93"O	36m	
MF 128	7°31'26.99"S	48°28'31.02"O	38m	
MF 129	7°31'27.00"S	48°28'31.32"O	41m	



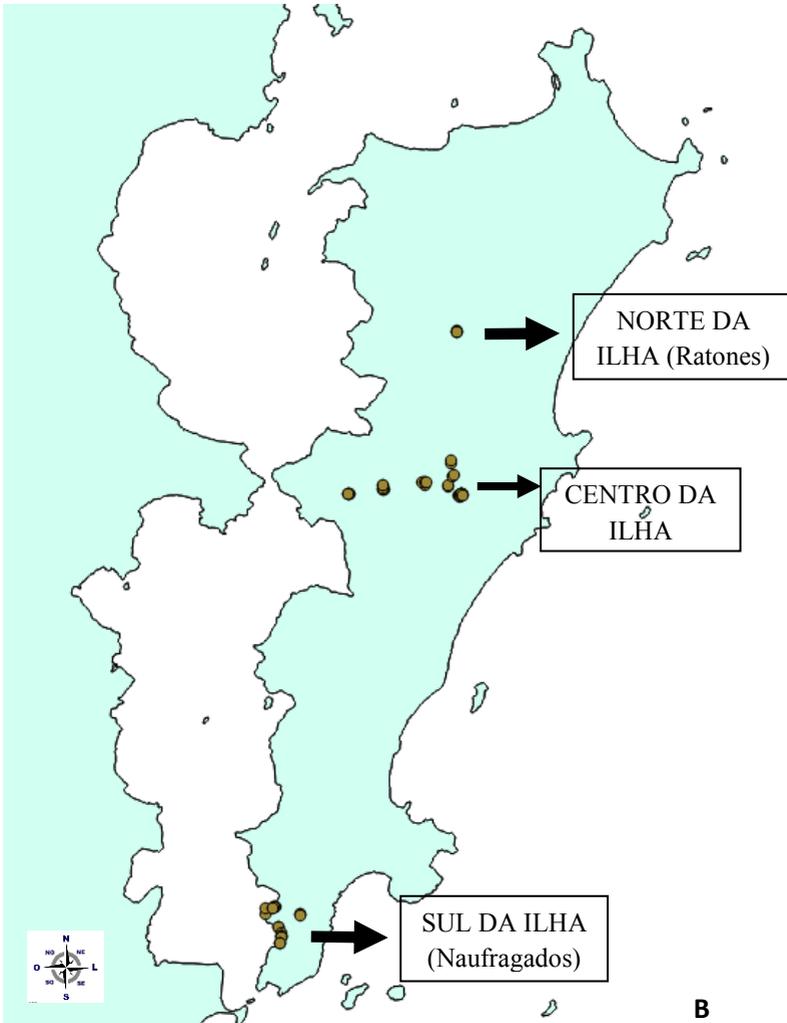


Figura 9: Mapa da Ilha de Santa Catarina, Brasil, com (A) localização da Ilha de Santa Catarina no mapa do Brasil e no mapa do estado (B) os pontos das Localidades de coleta de *Phellinotus*

piptadeniae, realizadas nas partes norte, centro e sul da Ilha, em hospedeiro vivo de *Piptadenia gonoacantha*.

Os basidiomas foram coletados manualmente ou, quando fora do alcance das mãos, com a utilização de podão. Em seguida, os basidiomas foram armazenados em sacos de papel, respectivamente identificados com número de coletor, data e local de coleta. Pontos de geo-referenciamento também foram anotados.

Em laboratório, pós-campo, fragmentos dos basidiomas ainda frescos foram retirados com lamina estéril, envoltos em papel manteiga e acondicionados em sacos hermeticamente fechados (tipo *Ziplock*®) com sílica, a fim de preservar o DNA para estudos moleculares. O restante dos basidiomas foi mantido por 12h à 24h em estufa para desidratação (30°C a 35°C).

10.2 Extração de DNA total

A extração de DNA total a partir dos basidiomas foi realizada com base no protocolo de Doyle & Doyle (1987),

modificado por Góes-Neto (2005). Aproximadamente 80mg a 120 mg de fragmentos de basidiomas foram maceradas com o auxílio de pistilos e cadinhos(almofariz) de porcelana com nitrogênio líquido até a formação de um pó fino. Esse macerado foi transferido a microtubos de 2 ml onde foram adicionados de 800ul a 900ul de tampão de extração a base de CTAB (2 % CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1% PVP e 2% β -mercaptoetanol) pré-aquecido em banho-maria a 65 °C.

Para garantir total contato do tampão com o macerado, foi usado um vórtex de bancada para agitação da solução que em seguida foi transferida para banho-maria a 65 °C por 40 minutos. Durante os primeiros 10 minutos foi feito choque térmico em intervalos de 2 minutos, sendo os tubos levados ao *freezer* -20 °C até o congelamento e depois recolocados no banho-maria com inversão dos tubos. Em seguida se seguiu os restantes 30 minutos de incubação a 65 °C.

Dado o tempo, os microtubos foram retirados do banho-maria, e centrifugados por 6 minutos a 12.000 rpm para separação da fase sólida da fase líquida. Em capela de exaustão, foi

realizada retirada do sobrenadante (porção líquida) e transferência desse conteúdo para outro tubo de 2 ml, com o acréscimo de 1,0 ml clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1. Os microtubos foram novamente agitados em vórtex de bancada para homogeneizar a solução. Depois deste procedimento, os tubos foram centrifugados por 10 min a 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 ml, sendo neste acrescentados etanol absoluto a -20 °C no mesmo volume da quantidade de sobrenadante transferido em cada um dos tubos. Os tubos permaneceram durante 2 h em *freezer* -20 °C para a precipitação dos ácidos nucleicos e então centrifugados por 10 min a 12.000 rpm para a formação do precipitado ou *pellet*. Após a formação do *pellet*, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com 1,0 ml de etanol 80%. Após isso, o *pellet* permaneceu secando durante 30 minutos em banho seco a 30°C. Posteriormente, o *pellet* foi ressuspenso em 15 µl de água MiliQ autoclavada. Por fim, os tubos foram acondicionados em *freezer* -20 °C para as posteriores análises moleculares.

10.3 Quantificação de DNA Total

A quantidade e qualidade do DNA total foi avaliada por estimativa visual em gel de agarose a 0,8% (Sambrook e Russel, 2001) corado com GelRed® por comparação com o padrão de bandas do marcador 1 kb DNA ladder (New England Biolabs®), e pelo espectrofotômetro Nanodrop 1000® (Thermo Scientific®).

10.4 Padronização da amplificação via reação em cadeia da polimerase – PCR

Os extratos foram submetidas à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase(PCR) em que foram empregados os pares de *primers* ITS1/ITS4 (White et al. 1990) conservados para a região de rDNA, para amplificação respectivamente da região (ribossomal) espaçadora interna transcrita (*Internal transcribed spacer*), RPB2 25F/RPB2 7.1R que codifica a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (Matheny et al. 2007), TEF1 α que codifica o fator de alongação 1- α da tradução (Roger et al. 1999; Lievens et al, 2008), ATP6 2/ ATP63 (*ATPase subunit 6*) do DNA mitocondrial (Giachini et al 2010, Kretzer & Bruns 1999), β tub a/ β tub b (Stefan et al 2004; Kawchuk et al 2002, Germain et al 2009).

Para as reações foi usado o reagente Master Mix (ABM®) com diluição para volume final de 25 μL por reação (Tabela 2). As amplificações dos cinco marcadores foram efetuadas com base em literatura e ajustes pontuais nas temperaturas de anelamento e números de ciclagem foram feitos durante o processo de padronização (Tabela 3) que se deu até que o produto de amplificação fosse uma banda única, nítida e de tamanho em pares de base correspondente ao tamanho do fragmento alvo.

Tabela 2. Componentes e concentrações utilizadas nas reações de amplificação PCR para os cinco marcadores moleculares utilizados.

COMPONENTES	VOLUME
DNA	4 μL
MASTERMIX ABM	10 μL
PRIMER 1 (10 μM)	0,5 μL
PRIMER 2 (10 μM)	0,5 μL
ÁGUA MILIQ NUCLEASE FREE	10 μL
Volume final da reação (μL)	25

Tabela 3. Condições de ciclagem (temperatura T °C e tempo) para a amplificação PCR dos cinco marcadores moleculares usados.

PASSO	DESCRIÇÃO	MARCADOR ITS		MARCADOR ATP6	
		T °C	TEMPO	T °C	TEMPO
1	Desnatura Inicial	95	2'	94	2'
2	Desnaturação	95	30''	94	35''
3	Anelamento	60	30''	37	55''
4	Extensão	72	1'	72	1'
5	<i>Numero de Ciclos</i>		5		5
6	Desnaturação	95	30''	94	35''
7	Anelamento	65	30''	45	55''
8	Extensão	72	1'	72	1'
9	<i>Número de Ciclos</i>		25		30
10	Extensão Final	72	10'	72	10'

PASSO	DESCRIÇÃO	MARCADORRPB2		MARCADOR TEF1	
		T °C	TEMPO	T °C	TEMPO
1	Desnatura Inicial	94	2'	94	2'
2	Desnaturação	94	40''	94	30''
3	Anelamento inicial	60	40''	66	30''
	Anelamento final	53	40''	57	30''
4	Extensão	72	2'	72	1'
5	<i>Numero de Ciclos</i>		8	10	
6	Desnaturação	94	45''	94	30''
	Anelamento inicial	53	1'30''	56	30''
8	Extensão	72	2'	72	1'
9	<i>Numero de Ciclos</i>		36	36	
10	Extensão Final	72	10'	72	10'

PASSO	DESCRIÇÃO	MARCADORBTUB	
		T °C	TEMPO
1	Desnatura Inicial	94	3'
2	Desnaturação	92	30''
3	Anelamento	56	30''
4	Extensão	72	1'
5	<i>Numero de Ciclos</i>		36

6	Extensão Final	72	10'
---	----------------	----	-----

**Termociclador BioradC1000*

10.5 Purificação pós-amplificação

Após cada reação de amplificação, os produtos foram purificados, com o intuito de retirar resíduos de *primers* e DNTP's não incorporados durante as amplificações.

A cada reação, foram adicionados 20,0 µL de PEG 8000 20% contendo cloreto de sódio a 2,5 M. As reações foram agitadas em Vortex e incubadas por 30 min a 37 °C no termobloco do Termociclador. Em seguida, as reações foram centrifugadas durante 15 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 125,0 µL de etanol, gelado, a 80% para a lavagem do *pellet*. As reações foram centrifugadas em temperatura ambiente durante 7 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi novamente removido e em seguida foram adicionados 125,0 µL de etanol 80% gelado, para a lavagem do *pellet*. As reações foram novamente centrifugadas em temperatura ambiente durante 7 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi removido e se deixou o *pellet* secar em temperatura ambiente por

8h. O pellet foi ressuspensionado em 15,0 μ L de água ultra pura autoclavada.

O produto de PCR purificado foi posteriormente quantificado por estimativa visual em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed (Biotium®), por comparação com o padrão de bandas do marcador 1 kb DNA ladder (New England Biolabs®).

10.6 Reações de sequenciamento

Depois de amplificados e purificados, os produtos de amplificação dos cinco marcadores foram sequenciados, pelo método de Sanger (Sanger et al. 1977), com o kit Big Dye Terminator V3.1 (*Applied Biosystems*) em um sequenciador de DNA ABI 3500 XL (*Applied Biosystems*).

10.7 Alinhamento e montagem de sequências

As sequências obtidas para cada indivíduo (uma para o iniciador direto e uma para o iniciador reverso) para cada um dos marcadores foram alinhadas e editadas para construção da sequência consenso. Em seguida, com as sequências já editadas

foi feito um múltiplo alinhamento para observação dos polimorfismos. Para essa etapa foi utilizado o *software* Geneious versão 6.1.8, segundo o algoritmo *Muscle*.

10.8 Análises genéticas

10.8.1 Análise dos Dados- Leitura das Sequências

A leitura das sequências de DNA obtidas, assim como alinhamento par a par para obtenção da sequência consenso de cada indivíduo e o alinhamento múltiplo foi realizada através do programa Geneious V.6.

10.8.2 Parâmetros intra populacionais

Os parâmetros da estatística descritiva como número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π), número médio de diferenças nucleotídicas (k) foram obtidos a partir do programa DnaSP v.5 (Librado & Rozas, 2009). Os valores do parâmetro diversidade haplotípica podem variar entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1, maior a diversidade entre os haplótipos analisados.

10.8.3 Testes de Neutralidade

Foram realizados os testes F_s de F_u e D de Tajima por meio do programa DnaSP v.5 (Librado & Rozas, 2009). Os testes de neutralidade avaliam se os polimorfismos observados nas sequências seguem o modelo de variação neutra, entretanto os cálculos para cada teste são baseados em parâmetros distintos. O teste F_s de F_u é baseado na distribuição de frequência dos haplótipos em função de θ ($\theta=4N\mu$, em que N corresponde ao tamanho efetivo da população e μ à taxa de mutação por sequência por geração). Valores negativos e significativos para F_s são indicativos de expansão populacional (Fu, 1997). O teste D de Tajima baseia-se nas diferenças entre o número de sítios segregantes (polimórficos) e o número de diferenças nucleotídicas. Valores negativos e significativos para o D de Tajima sugerem seleção purificadora, efeito carona ou expansão populacional; enquanto que os valores positivos são indicativos de seleção estabilizadora ou contração populacional (Tajima, 1989).

10.8.4 *Mismatch Distribution*

A *Mismatch Distribution*, realizada por meio do programa DnaSP v.5 (librado & Rozas, 2009), avalia a distribuição das

diferenças nucleotídicas pareadas entre indivíduos, investigando a história demográfica das populações. Ela permite discriminar entre populações que permaneceram estáveis ao longo do tempo (curvas multimodais) e populações que sofreram expansão demográfica a partir de uma população fundadora pequena (curva unimodal) (Rogers & Harpending, 1992; Mousset et al. 2004; Lopes, 2006; Aoki et al. 2008).

10.8.5 Distâncias Genéticas

A composição nucleotídica e a distância genética entre os organismos foram obtidos com auxílio do programa MEGA v.7 (Tamura et al. 2007). A dissimilaridade genética pode variar entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1 mais distantes geneticamente são as populações analisadas.

11. RESULTADOS

11.1 Análises das sequências

Dos 74 indivíduos coletados, para as cinco regiões amplificadas, apenas três marcadores (ATP6, ITS e RPB2) tiveram um número de sequências consenso que pudessem gerar respostas resolutivas para as análises propostas. À medida que as análises foram sendo realizadas, o marcador RPB2 não revelou polimorfismo algum e não foi usado para as inferências. Na tabela 4 são apresentadas as relações entre marcadores e quantidades de sequências.

Tabela 4. Marcadores genéticos utilizados e número de sequências obtidas para cada um deles, respectivamente, de coletas de *Phellinotus piptadeniae* realizadas em hospedeiros vivos de *Piptadenia gonoacanthana* Ilha de Santa Catarina.

MARCADOR	TOTAL DE SEQUÊNCIAS GERADAS
ATP6	48
ITS	43
RPB2	35
TEF1 - α	21
β -TUB	12
Total	159

Nas sequências de DNA dos indivíduos analisados, para a região ITS, foram detectados um sítio polimórfico e dois haplótipos, que apresentaram diversidade haplotípica de 0,038. A diversidade nucleotídica (π) foi de 0,0028. A distância genética observada entre os organismos de *P. piptadeniaefoi* de 0,002, fato que evidencia que os indivíduos são muito próximos geneticamente.

Já para a região ATP6, foram detectados seis sítios polimórficos e quatro haplótipos, que apresentaram diversidade haplotípica de 0,035. A diversidade nucleotídica (π) foi de 0,00136. A distância genética observada entre os organismos de *P. piptadeniaefoi* de 0,004, ou seja, reafirmando o que o marcador its já havia indicado: proximidade genética entre os organismos.

Na tabela 5 estão reunidos os valores relativos a diversidade genética dos organismos por marcador segundo análise geral, de acordo com as três localidades de coleta.

Tabela 5. Diversidade genética de *Phellinotus piptadeniae* nas localidades de coleta (Centro, Sul e Norte da Ilha de Santa Catarina) baseados nos dados gerados pela análise das sequências parciais de

ITSe ATP6. N = Número de sequências; h = Número de Haplótipos; S = Número de sítios polimórficos/segregantes; π = Diversidade Nucleotídica; Hd = Diversidade Haplótípica.

Localidade	N	h	S	π	Hd
Total ITS	43	2	1	0,0028	0,038
CENTRO	19	3	2	0,00089	0,257
SUL	21	2	1	0,00077	0,111
NORTE	2	1	0	0	-
Total ATP6	48	4	6	0,00136	0,035
CENTRO	28	3	3	0,00105	0,474
SUL	17	3	4	0,00167	0,559
NORTE	3	2	1	0,00123	0,667

Quanto à composição nucleotídica das sequências de DNA dos organismos para a região atp6 observou-se, em média, 44,1% de timina (T), 14,5% de citosina (C), 26,8% de adenina (A) e 14,5% de guanina (G). É possível observar que a quantidade de bases nitrogenadas A-T é superior a de C-G. Esse fato vai ao encontro do que a literatura reúne como recorrente no genoma mitocondrial (Crozier & Crozier, 1993; Kim et al. 2006; Bergamaschi et al. 2007).

11.2 Testes de Neutralidade

Os valores obtidos para D de Tajima e para FS de Fu & Li estão reunidos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados dos testes de Neutralidade baseado nos testes para as regiões ITS e ATP6 de *Phellinotus piptadeniae* da Ilha de Santa Catarina coletados em hospederiro vivo de *Piptadenia gonoacantha*. **F** - Teste F de Fu & Li; **D** – Teste D de Fu&Li. = F

Marcador	Fu & Li's D & F	Tajima's D
ITS	D = -1.85254, F = -1.89169	-1.09883
ATP6	D = -3.08774, F = -2.93302	-1.22888

Os valores obtidos para o teste D de Tajima não foram significativos para nenhum dos marcadores, porém, o valor obtido para o teste Fs de Fu, para ATP6 foi significativamente negativo (para valor de $p = 0,05$), sendo, portanto, indicativo de expansão populacional.

Os valores de *Fst* e *Gst*, indicadores de fluxo gênico (Tabela 7 e 8), não foram significativos para nenhum dos dois marcadores estudados.

Tabela7. Diferenciação entre os valores dos índices F_{ST} (diagonal superior) e G_{ST} (diagonal inferior) para o marcador molecular ITS com as respectivas localidades de coleta de *Phellinotus piptadenia* coletados em hospedeiro vivo de *Piptadenia gonoacantha*.

	NORTE	CENTRO	SUL
NORTE	0	0	0
CENTRO	0	0	0
SUL	0.08163	0.00025	0

Tabela 8. Diferenciação entre os valores dos índices de F_{ST} (diagonal superior) e G_{ST} (diagonal inferior) para o marcador molecular ATP6 com as respectivas localidades de coleta de *Phellinotus piptadenia* coletados em hospedeiros vivos de *Piptadenia gonoacantha*.

	NORTE	CENTRO	SUL
NORTE	0	0.00125	0.00023
CENTRO	0.06077	0	0.00152
SUL	-0.00635	0.06742	0

11.3 Mismatch Distribution

O gráfico obtido a partir do número médio de diferenças nucleotídicas apresentou distribuição unimodal para o marcador *atp6* (Figura 12); já o gráfico obtido a partir do número médio de diferenças nucleotídicas, para a região *its* não revelou nenhuma moda ou variação sendo indício de que há estabilidade ao longo do tempo (Figura 13).

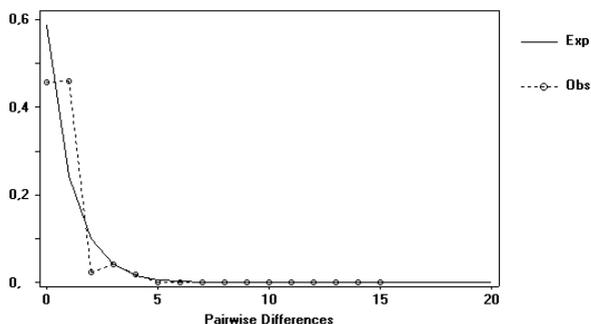


Figura 12. Representação gráfica da curva gerada pelas diferenças par a par das sequências (*Mismatch Distribution*) da região ATP6 para os organismos de *Phellinotus piptadeniae* amostradas na Ilha de Santa Catarina sobre hospedeiro vivo de *Piptadenia gonoacantha*. A distribuição esperada de diferenças par a par, é mostrada em linha contínua e a distância observada pela linha pontilhada.

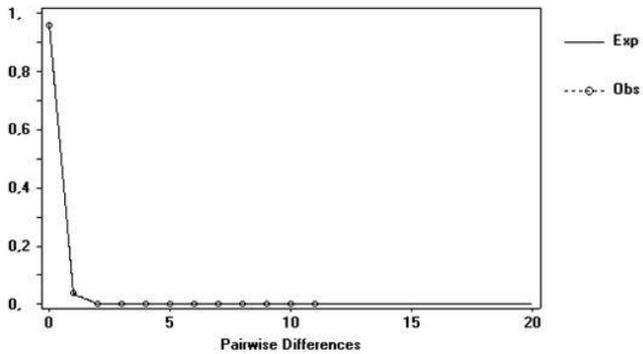


Figura 13. Representação gráfica da curva gerada pelas diferenças par a par das sequências (*Mismatch Distribution*) da região ITS para os organismos de *Phellinotus piptadeniae* amostradas na Ilha de Santa Catarina sobre hospedeiro vivo de *Piptadenia gonoacantha*. A distribuição esperada de diferenças par a par, é mostrada em linha contínua e a distância observada pela linha pontilhada.

12. DISCUSSÃO

As análises de diversidade genética populacional de *Phellinotus piptadeniae*, a partir das sequências de regiões gênicas, forneceram subsídios para uma interpretação preliminar sobre sua história demográfica, padrões evolutivos e a distribuição espaço-tempo da sua variabilidade genética na Ilha de Santa Catarina. Ainda, como resultados preliminares de um primeiro estudo com o propósito de investigar diversidade genética populacional de fungos Hymenochaetaceae da América do Sul, são levantadas diretrizes para estudos futuros, bem como com desdobramentos para a conservação das espécies. Consequência natural dessa investigação é também avaliar e discutir a utilidade de certos marcadores e suas respectivas taxas evolutivas como ferramentas resolutivas para a genética de população em macrofungos, especificamente de Hymenochaetaceae.

12.1 Os marcadores e a variabilidade

Dos cinco marcadores acessados, três deles (ITS, RPB2 e ATP6) foram utilizados nas análises de diversidade. O marcador RPB2 não apresentou nenhum polimorfismo, sendo, portanto, não efetivo no estudo proposto. Mas isso não significa que não seja válido para estudos de diversidade, é necessário um aperfeiçoamento e padronização do uso desse marcador visto que em um recente trabalho (Song et al. 2017) foi utilizado RPB2 como um dos marcadores na análise *multi-loci* em estudo de tempo de divergência e biogeografia histórica de *Laetiporus Murrill* (*Fomitopsidaceae, Polyporales*). Esse táxon (*Laetiporus*), embora pertença a outra família, também tem uma íntima relação com plantas, no caso do gênero *Quercus* L. Os resultados gerados, dentre outros aspectos, revelaram que existe similaridade entre o tempo de divergência entre fungo e planta, cenário da relação parasita-hospedeiro que se assemelha com a relação *Phellinotus piptadeniae* e *Piptadenia gonoacantha*.

Quando comparados os dois marcadores que apresentaram níveis maiores de polimorfismos nas análises de diversidade, o mitocondrial ATP6 e ribossomal ITS, é perceptível que a quantidade e a diversidade dos haplótipos são sempre menores

para esse último no que diz respeito ao número de haplótipos e o número de sítios polimórficos. O marcador ATP6 é amplamente usado em estudos populacionais (Freeland et al. 2003; Hufbauer et al. 2004; Lewter et al. 2006; Li et al. 2006). Essa região gênica tem sido utilizado e é preferível ao invés do DNA nuclear para tais estudos, porque além de ser um marcador de fácil manipulação em laboratório (fácil amplificação, por exemplo) (Hoy, 2003), o mtDNA possui taxa evolutiva (a taxa de substituições de base) mais alta quando comparada com o DNA nuclear (Arias et al. 2003). O emprego do mtDNA em estudos populacionais e evolutivos se vale principalmente do fato dele possuir uma alta taxa de substituições de base, apresentar alterações no tamanho total da molécula devido a inserções e deleções e, principalmente na região rica em A+T; mais recentemente, seu emprego se vale devido ao fato de que translocações de genes codificadores de tRNA parecem ser mais frequentes do que se imaginava, acarretando assim em alterações na ordem gênica entre organismos filogeneticamente relacionados (Arias, 2003).

A evolução do genoma Mitocondrial difere sensivelmente entre os grandes grupos de Eucariotos (Aguilera, et al., 2014); o genoma mitocondrial em animais são ricos em genes, poucos

intronse com alto grau de evolução de suas sequencias (Boore, 1999). Em plantas, existem maiores taxas de recombinação incluindo grandes regiões intergênicas (Palmer et al, 2000).

Embora os genomas mitocondriais em fungos sejam pouco estudados é sabido que apesar de que o conteúdo do gene mitocondrial seja amplamente conservado, sua ordem relativa dos genes é altamente variável, tanto entre como dentro dos principais filos do Reino (Paquin et al. 1997). Uma diferença entre os dois grandes filos Ascomycota e Basidiomycota, é que na maioria dos ascomicetos, os genes são tipicamente codificados na mesma cadeia mtDNA, enquanto que nos basidiomicetos, eles podem ser codificados em ambas as cadeias de mtDNA (Aguileta, et al. 2014).

Embora os fungos sejam de uma linhagem filogenética mais proximamente relacionada aos animais, os mtDNAs nestes organismos mostram sinais de recombinação, característica mais parecida com os mtDNAs de plantas. Além disso, os genomas mitocondriais dos fungos podem ter grandes regiões intergênicas, incluindo repetições de sequência e *introns* (Lang et al. 2007).

A evolução da ordem dos genes nas mitocôndrias dos fungos, em particular nos basidiomicetos, sugere uma interação complexa de forças evolutivas que se opõe: embora os genes mitocondriaistendem a serem conservados no nível da sequência devido à sua importância no metabolismo celular, os genes do mtDNA dos fungos possuem significativa variação que se deve, principalmente, à recombinação intramolecular não homogênea (Lavagnini, 2011; Aguilera, et al., 2014).

A literatura reúne muitos trabalhos para grupos de vertebrados e invertebrados que utilizam sobretudo marcadores mitocondriais.

Em estudos de Hymenoptera, por exemplo, especialmente com meliponíneos, os estudos empregando o mtDNA como marcador em estudos populacionais e evolutivos, embora recentes, segundo os pesquisadores do grupo, acrescenta novas informações e funcionam efetivamente como ferramenta no entendimento da biologia e evolução do grupo (Arias et al. 2003; Meixner et al. 2000; Smith et al. 2000).

Embora o rDNA ITS seja um marcador nuclear amplamente utilizado como DNAbarcoding, com seu uso

difundido pela disponibilidade de *primers* universais, multicópia, de herança biparental e consideráveis níveis de variação genética para estudos infra-genéricos (Alvarez & Wendel, 2003), a quantidade de mutações encontrada na região utilizada no presente estudo não foi estatisticamente significativa. Pela interpretação dos dados gerados por esse marcador a população não tem sofrido a pressão das forças de seleção. Fato similar é relatado em alguns trabalhos com espécies de *Dipera* que mostram que, em nível intra específico, envolvendo comparações entre indivíduos ou populações dentro de uma mesma espécie, a sequência do ITS tende a ser muito similar, o polimorfismo intraespecífico é praticamente inexistente (Douglas & Haymer, 2001; Pezotto, 2008).

Uma possível explicação para a baixa variabilidade encontrada nos resultados gerados por esse marcador seria o fato de que as regiões do ITS desempenham um papel importante no processamento de rRNA. A maturação dos rRNA e o processo de *splicingsão* dependentes da estrutura secundária do ITS o que torna necessária a existência de uma forte pressão de seleção para que as sequências e estrutura dessa região sejam mantidas conservadas (Hillis & Dixon 1991; Goel et al. 2007). Todavia,

não se pode perder de vista nas inferências feitas aqui, que a amostragem foi baixa e restrita as populações da região insular.

O marcador ATP6 foi aquele cujos dados são significativos estatisticamente, ou seja, a probabilidade de significância observada foi menor que o nível de significância α (5%) definido para o estudo. Num primeiro momento pode parecer um dado controverso, já que a ordem em que os marcadores estão arrançados nesse genoma é muito conservada, principalmente em se tratando de codificadores de proteínas (Crozier & Crozier 1993).

12.3 Índices de Diversidade e Neutralidade:

Embora os dados da maioria dos testes estatísticos realizados no presente trabalho não tenham sido significativos, em especial em função da amostragem, os testes de neutralidade detectaram eventos de expansão populacional. Valores não significativos são indicativos de ausência de modificações no tamanho populacional, fraca seleção ou seleção neutra, ou seja, as populações amostradas se encontram em equilíbrio entre mutação e deriva genética. Mesmo que os valores de *Gst* e *Fst* indiquem

panmixia para os organismos na ilha de Santa Catarina, isso não significa que na história recente desse grupo de organismos não tenha ocorrido eventos que alterassem o equilíbrio. A possibilidade de que tenham ocorrido eventos de expansão populacional é comprovada pelos resultados dos testes de neutralidade de Fu e Li (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) e pelas curvas do gráfico de *Mismatch Distribution*.

Neste estudo, o teste D de Tajima apresentou um valor não significativo, $-1,09883$, $P > 0,10$, $-1,22888$, $P > 0,10$, para ITS e ATP6, respectivamente. O teste proposto por Tajima (1989) compara o número de sítios segregantes com o número médio de diferenças de nucleotídeos os quais são estimados a partir de comparações par a par das sequências de DNA dentro de uma população. É usado para testar a hipótese de que todas as mutações são seletivamente neutras.

Nesse estudo, o teste de Fu e Li apresentou um valor significativo apenas para o marcador ATP6, $-3,08744$, $P \leq 0,05$. O teste proposto por Fu avalia a probabilidade de certo número de haplótipos ser observado, valores negativos podem ser interpretados como sinal de seleção purificadora ou alternativamente, como expansão demográfica recente. Os valores

negativos encontrados para o teste permitem a interpretação de que uma expansão populacional recente aconteceu e são indicativos de que um evento anterior reduziu a frequência de mutações e o tamanho populacional de forma significativa, refletindo um desvio no modelo e neutralidade. Isso acontece porque, de modo geral, eventos que reduzem drasticamente o número de organismos tendem a remover alelos raros e os alelos intermediários serão menos frequentes (Ruiz-pesini et al 2004). A diferença entre a sensibilidade dos dois testes (D de Tajima e Fu e Li) vai ao encontro do que sugere Ramos-Onsins e Rozas (2002), que o teste de Fu e Li é um teste estatístico mais poderoso para demonstrar a recente expansão populacional é o F_s de Fu (Fu, 1997).

Motoo Kimura (1968) e King & Jukes (1969) foram os primeiros a sugerir que a maioria dos polimorfismos são seletivamente neutros. A teoria neutra fornece uma hipótese de nulidade para a evolução molecular. Isto é, ela descreve matematicamente como seria a dinâmica populacional de novos alelos na ausência de vantagens adaptativas conferidas por algum alelo, ou seja, quando apenas os eventos de deriva genética contribuem para fixação desse alelo na população já que a seleção

purificadora apenas elimina as variantes de menor valor adaptativo (Futuyma, 1997).

O modelo de nulidade vai ao encontro da necessidade de fornecer evidências que corroborem a seleção positiva. Como afirma Nielsen (2001), a seleção positiva ocorre quando uma nova mutação seletivamente vantajosa (que aumentam a aptidão) está segregando em uma população. O interesse, deste tipo particular de seleção, é que ele pode fornecer evidências para a adaptação ao nível molecular, contribuindo para compreender as relações entre genótipo e fenótipo.

12.4 *Mismatch distribution* – distribuição de diferença par a par

O gráfico (Fig. 13 e 14) da distribuição par a par dos marcadores ITS e ATP6 tem curvas unimodais. Populações que apresentam uma distribuição unimodal de diferenças par a par nos nucleotídeos, com variância relativamente pequena, experimentaram uma fase de expansão recente (Rogens & Harpending 1992). Esse resultado vai ao encontro do que sugere a estatística de Fu e Li para o marcador ATP6. Com a expansão

populacional, tende-se a acumular um número médio de diferenças par a par do que o esperado numa situação de estabilidade no tamanho populacional (Statkline & Hudson 1991, Roger & Harpending 1992).

Como é possível observar na Tabela 6, o número de sítios polimórficos identificados em *Phellinotus piptadeniae*, para a região ATP6 deste estudo, pode ser considerado alto, o que poderia ser interpretado em função da rápida taxa de evolução da região controle do mtDNA (Brown e Simpson 1982). A diversidade haplotípica encontrada foi alta e a diversidade nucleotídica foi baixa. A combinação de valores altos para diversidade haplotípica e baixos para diversidade nucleotídica poderia sugerir que a população é composta por um amplo número de haplótipos fortemente relacionados, um cenário que poderia ser esperado após um recente evento demográfico, que tanto poderia ser uma expansão como contração populacional recente (Nyakaana et al., 2008; Gonçalves et al., 2009). Tal cenário é encontrado na literatura em trabalhos com outros grupos de organismos como vertebrados (Grazziotin et al. 2006; Pellegrino et al 2005; Bell et al 2012) e invertebrados (Francisco, 2012) cujos autores justificam a baixa diversidade encontrada

pela recolonização de áreas após afunilamento populacionais. As diversidades genéticas baixas encontradas atualmente seriam reflexo da expansão populacional após o afunilamento.

As evidências mostram que há fluxo gênico entre os organismos das diferentes localidades. Algumas possibilidades, independentes ou conjuntas, poderiam explicar tal proximidade genética, além da proximidade geográfica, dos espécimes amostrados. Como por exemplos: a ação antrópica, as correntes de ar, a proximidade das matas às áreas urbanas e o potencial reprodutivo da própria espécie fúngica. As influências dos efeitos da dispersão antropogênica já foram observados e verificados em outros grupos de organismo como as plantas (Ryne e Bensch, 2008) e alguns insetos fitófagos (Oliver, 2006; Alvarez et al. 2007). Quanto à influência das correntes de ar na dispersão, os ventos tendem a exercer efeitos locais, a priori, mas em tempestades violentas, os esporos dos organismos podem ser amplamente disseminados entre as localidades (Brown & Lomolino, 2006) em função da velocidade dos ventos das correntes de ar contribuindo assim para a homogeneização das populações, desde que se fixem no novo local. A proximidade das matas às áreas urbanas tem a ver com o fato de que o hospedeiro

(Pau jacaré) é uma planta comum às áreas em regeneração (Carvalho, 2004), sendo assim, sua presença aumenta em ambientes antropizados ou que se encontram nos primeiros estágios de sucessão.

O que se observa então é a inexistência de estruturação genética heterogênea que possa ser detectável entre indivíduos nas diferentes localidades, reflexo da ausência de barreiras significantes que poderiam isolar os organismos encontrados nas diferentes localidades. Ao mesmo tempo, os dados não podem ser considerados conclusivos, e sim sugestivos, isso porque a ausência da referida estruturação é passível de diferentes interpretações. Uma delas seria a conclusão de que as populações estariam proximamente ligadas, existindo fluxo gênico entre elas e a baixa variabilidade genética encontrada seja resultado da ocorrência de um evento populacional, a saber: efeito do fundador devido a colonização recente ou um evento de seleção, no qual a diversidade foi bastante reduzida resultando em pouquíssimos haplótipos. Além dessas perspectivas, outros fatores podem estar relacionados com o padrão observado como um evento do tipo efeito gargalo de garrafa. Em estudo realizado com mamíferos aquáticos do gênero *Sotalia*, Corrêa, (2010), percebeu que os

gráficos de *Mismatch distribution* geraram uma curva unimodal e os valores negativos e significativos encontrados nos testes de neutralidade D e F_s para duas das populações em estudo sugerem expansão do populacional, uma evidência contra a neutralidade das mutações. Tal perfil dos resultados vai ao encontro do fato de que após a separação da espécie em marinha e fluvial, a espécie *Sotalia guianensis* provavelmente sofreu expansão ao longo da costa brasileira até a região Sul.

Eventos evolutivos do tipo gargalo populacionais resultam na perda da variabilidade genética (Franks et al. 2011). A baixa variabilidade genética e a ausência de estruturação genética acarretaram na formação de poucos haplótipos sendo esses compartilhados por grande parte dos indivíduos. Mesmo com suficiência amostral reduzida, os dados associados ao passado demográfico obtidos neste trabalho revelam uma expansão demográfica recente. Para essa expansão é possível duas sugestões de eventos considerando de curto a longo prazo: Histórico do uso da Ilha e a teoria dos refúgios após evento de Glaciação.

Segundo a premissa do histórico de uso da Ilha, o pau jacaré tem sua madeira como fonte de recurso para a construção (Carvalho, 2004), o que sugere que a retirada dessa planta pode ter contribuído para o declínio populacional do fungo no sentido da diminuição potencial do substrato. Associado a esse fato, também há a biologia dessa espécie de planta, que é pioneira, típica de áreas em regeneração. Para premissa da teoria dos refúgios, segundo Pretince & Jolly, 2000, o último período de glaciação ocorrido há aproximadamente 12.000 anos, criou condições de calor e frio que levaram a contração das áreas florestais em refúgios, reduzindo o habitat disponível para as espécies, ocasionando grupos em processo de expansão. Tal fenômeno poderia explicar o alto grau de endemismo para a Mata Atlântica (Francisco, 2012) e os padrões de baixa diversidade genética encontrados em certos grupos de organismos, como de répteis, anfíbios e abelhas (Pellegrino et al. 2005, Grazziotin et al. 2006; Carnaval et al. 2009; Batalha-Filho et al. 2010).

Sendo assim, a baixa diferenciação genética entre os organismos poderia ser explicada também pelo pouco tempo de isolamento das mesmas, seguida da baixa variabilidade genética ocasionada por efeitos de gargalo de garrafa, tornando assim as

populações quase homogêneas. Nessa análise entra também a discussão de que a biologia dos fungos pode ter padrão de fluxo gênico homogêneo com área superior a que foi amostrada. Em outras palavras a amostragem tenha sido feita em uma área pequena frente ao real do potencial de dispersão da população.

Ao mesmo tempo em que os eventos de história natural e demográfica são discutidos, não é possível descartar a possibilidade de que a falta de estruturação pode ser consequência da escolha de marcadores que não apresentam sensibilidade suficiente para a detecção de polimorfismos (Zagonel, 2009). Levando em consideração as análises de ITS para as localidades amostradas os marcadores não apresentam valores significativos para nenhum dos testes utilizados para estudos populacionais de Macrofungos já que são conservados e não foi eficiente para detectar a diferenciação genética intraespecífica.

12.5 O fluxo gênico e a dispersão de esporos

Os dados revelam alto grau de homogeneização de *Phellinotus piptadeniaena* Ilha de Santa Catarina. Na Tabela 7 é

possível observar o forte indicativo de que a população está fixada e que o fluxo gênico não gera diferenciações.

A estrutura populacional de uma espécie, o conjunto de suas características genéticas e demográficas, é resultado da ação e das interações de uma série de mecanismos evolutivos e ecológicos (Sodero-Martins, 1987). Um elemento desse entendimento atravessa o conceito de fluxo gênico. Fluxo gênico é movimento de genes de uma população para a outra. Se genes são transportados a uma população onde esses genes não existiam previamente, fluxo gênico pode ser uma fonte muito importante de variação genética. O compartilhamento dessas variantes geradas retarda o processo de diferenciação populacional (Oikawa, 2004).

Sobre as barreiras que poderiam diminuir o fluxo gênico em Macrofungosa literatura nos mostra estudos de interesse agrônomo, mas mesmo assim, é possível fazer uma aproximação quando comparamos essas literaturas (Reis, 1984; Hoy et al. 1991; Blum & Dianese 2001; Panisson et al. 2002) a nossa realidade. Casa et al., (2003), em trabalho realizado com *Stenocarpella*(Earle)B. Suttodiscutem que vento e a umidade são os dois fatores mais significativos para a dispersão de esporos

deste grupo fúngico: a dispersão dos esporos pode se dar por respingos de chuva ou transportados livremente pelo vento (Casa et al. 2003).

O vento é o deslocamento do ar em relação à superfície terrestre (Ayoade, 2004). Sendo assim, a direção e a velocidade do vento, assim como o ritmo da pluviosidade, são fatores potenciais de alteração dos níveis de variação dentro e entre as localidades e populações. Alguns autores (Jain, 1982b; Martins, 1982) sugerem que nem sempre as distâncias de dispersão refletem diretamente o fluxo gênico efetivo. Daí a necessidade da utilização de marcadores genéticos para estimar intercruzamentos efetivo e movimento de genótipos.

Damasceno (2007), em trabalho realizado para estudar a distribuição de isolados da fase assexuada de *Glomerella cingulata*, fungo de interesse agrônomo, oriundos de diferentes regiões do Brasil e para verificar se a maior variabilidade do patógeno se deveu a diferenças entre ou dentro de patótipos (grupos classificados de acordo com os fatores de virulência) por meio de marcadores RAPD observaram uma correlação negativa entre as distâncias geográficas e as similaridades genéticas; a possível

explicação estaria relacionada ao livre intercâmbio de sementes de feijoeiro possivelmente contaminadas.

De, maneira geral, trabalhos mostram a co-evolução patógeno-hospedeiro geograficamente específica e uma forte influência do fluxo gênico na ampliação da variabilidade genética. Mesmo em um nível hierárquico considerado baixo, a diversidade genética pode ser mantida e até mesmo aumentada ao longo das gerações. (Damasceno, 2007; Talamini, 2006).

Camargo-Junior (2008) afirma que a alta diferenciação genética entre populações estudadas com diferentes níveis de diversidade genética observados em cada população é decorrente da interação do patógeno com diferentes cultivares do hospedeiro e consequentemente com diferentes *backgrounds* genéticos; assim sendo, a maior parte da variação genética entre populações é devido ao nível de fluxo gênico, pela distância geográfica e pelos diferentes alelos de resistência nas populações de hospedeiros.

Bajay, (2014) estudando *Piptadeniae gonoacantha*, por análise multiloci em localidades que estão distantes, em seus extremos, até 70km, percebeu que existem elevados valores de distância genética entre as populações; existe diversidade genética

e a distância entre as populações analisadas são grandes e não foi observado fluxo gênico entre elas. Ao mesmo tempo, existe forte endogamia em *P. gonoacantha*, provavelmente devido ao próprio processo evolutivo da espécie ao longo das gerações entre as populações, no entanto, os valores maiores das estimativas das análises estatísticas sugerem que o processo de restauração florestal que as localidades estão submetidas podem limitar os cruzamentos que ocorrem nessas áreas e aumentar o coeficiente de parentesco que não recebem pólen ou sementes provenientes de grandes distâncias.

Fora isso, quando se trata de um fungo que está em associação com outro ser vivo, como uma planta, é preciso associar também os fatores que afetam a dispersão do pólen, frutos e sementes (Levin e Kerster, 1974; Levin, 1984), no sentido de entender os mecanismos de dispersão do hospedeiro em potencial visto que a presença do fungo fitopatogênico é dada posteriormente a presença do hospedeiro.

Em se tratando do hospedeiro, Bajay (2014) que estudou a ocorrência da planta em localidades no interior de São Paulo, percebeu que a estrutura genética observada (ausência de fluxo entre as populações e elevada endogamia intra populacional) com

alta divergência entre as populações sugerem efeito de deriva genética. Os testes por realizados em seu trabalho mostram que existiu uma expansão populacional recente nas áreas. Essa expansão pode estar associada pelo histórico de intervenção antrópica e alterações ambientais, isso porque algumas localidades em que houve amostragem de *P. gonoacantha*, sofreu um processo de fragmentação muito intenso durante o cultivo do café, que abriu clareiras, que favoreceram o aparecimento de plantas de espécies secundárias iniciais.

Populações que são separadas por diversos tipos de barreiras podem se tornar total ou parcialmente isoladas geneticamente, promovendo endogamia. Os diferentes mecanismos e taxas de dispersão têm implicações diretas sobre a estrutura genética das populações e com os possíveis problemas que possam surgir com isolamento ou endogamia, no sentido da manutenção de seu patrimônio genético.

12.5.1 O que determina a abundância e a distribuição de uma espécie?

Se os dados refletem uma expansão da população da espécie fúngica, é possível cogitar que *Piptadenia gonoacantha*, seu hospedeiro, também pode estarem aumento da população, especialmente se considerarmos que essa espécie vegetal é uma espécie pioneira, abundante em áreas de regeneração (Carvalho, 2004). Neste caso, a expansão da população fúngica poderia apenas estar acompanhando a do seu hospedeiro. Por isso, quando se toca na discussão da conservação, é preciso refletir que o equilíbrio ecossistêmico não é linear, e que existem espécie que são dependes de outra seja para ocupação de espaço, seja para obtenção de recurso.

Quanto maior a diversidade genética maior a chance de adaptabilidade às pressões ambientais. Para tentar responder à pergunta que dá título a esse tópico é preciso, *a priori*, ter uma visão ampla: conhecer condições físico-químicas do ecossistema, seus padrões e dinâmicas; conhecer a história natural da espécie e os recursos que ela necessita (Viana, 2015).

Além disso, uma espécie pode se dispersar em uma área e não conseguir coloniza-la; esse último argumento se sobrepõe ao fato de *Phellinotus piptadeniae* ter sua distribuição relacionada com a ocupação do ambiente pela espécie vegetal que parasita.

12.6 Implicações para a conservação:

Estudos de genética de populações são ferramentas para a conservação. É importante entender como a variação genética está distribuída no ambiente para a eleição de áreas prioritárias para a conservação da espécie e do ecossistema na qual ela está inserida, já que possíveis distúrbios atuais ou futuros podem vir a eliminar haplótipos de baixa frequência (Klabunde, 2016).

A manutenção da diversidade genética fornece o potencial adaptativo e evolutivo de uma espécie. Por esse motivo, o conhecimento da composição genética de uma espécie, e de como ela está é fundamental para as ações de manejo e conservação. Ao mesmo tempo, a estruturação genética da planta hospedeira podem sugerir alguns indicativos; Bajay, (2014), em estudo dedicado a *Piptadenia gonoacantha*, revela que as distâncias entre as localidades em que foram amostradas as populações da planta nesse referido trabalho são grandes (as populações mais distantes estão a cerca de 70km umas das outras), no sentido de que são significativas para impedir que haja fluxo gênico entre elas. Quando confrontamos essa distância com as localidades amostradas aqui na Ilha, mesmo que na distância máxima dos extremos norte-sul dos pontos de coleta, se percebe que é quase a

metade daquela amostra por Bajay (2014), ou seja, as distancias entre os indivíduos aqui encontradas podem não ser significativas para isolamento. Além disso, como característica da região do interior de São Paulo onde as coletas de Pau jacaré foram realizadas no estudo citado, a fragmentação das áreas é bastante marcada em virtude do histórico uso da região na cultura do café (Bajay, 2014), ou seja, a desconexão entre as áreas é muito mais evidente e abrupta do que se vê ao longo da Ilha de Santa Catarina.

Se tratando do objeto de estudo do presente trabalho, existe uma relação espécie-específica entre o fungo e a planta e a perda da diversidade da espécie botânica implica, teoricamente, diretamente na diminuição da população do fungo. Ao mesmo tempo, é importante entender se a estruturação genética encontrada pelo recorte do estudo é uma característica natural da espécie estudada ou é resultado da presença de barreiras físicas causadas pelo homem, como no caso de fragmentação do habitat.

A fragmentação de hábitat é uma das maiores ameaças para a conservação da biodiversidade (Seoane, 2010) já que pode fazer com que os indivíduos de uma espécie se tornem restritos a

pequenas áreas, tornando-os isolados (parcial ou totalmente) das outras populações ou localidades onde há ocorrência da espécie.

A redução no tamanho populacional, originado a partir da fragmentação de hábitat, torna a população susceptível a variações ambientais, endogamia, perda de variação genética e acúmulo de mutações deletérias (Frankham, 1995a).

13. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A população apresenta alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica para o marcador ATP6. A hipótese de expansão recente teve suporte com o resultado significativo do Teste Fs de Fu para um dos marcadores usados, indo ao encontro do perfil da curva unimodal encontrada, que também reitera a hipótese de expansão. Porém, uma amostragem mais significativa poderia revelar outro padrão, visto que qualquer mutação já diminui o valor dos testes, pois a quantidade de sequências geradas foi baixa, mas também poderá confirmar o observado.

A partir dos resultados de diversidade nucleotídica baixa, diversidade haplotípica alta, rede de haplótipos em forma de estrela centralizada, *mismatch distribution* com padrão unimodal e teste de neutralidades com valores negativos é possível sugerir e/ou indicar que não existe diferenciação genética entre os organismos amostrados nas diferentes localidades da Ilha, e que a população passou por um gargalo evolutivo seguido de crescimento.

Existe uma necessidade de ampliar a amostragem assim como a quantidade de marcadores nas análises a fim de evitar que

os dados se tornem tendenciosos ou não revelem os polimorfismos.

Sob a ótica da conservação, a preocupação da Biologia de Populações, não é só entender a ação dos mecanismos micro-evolutivos que condicionam a estrutura populacional, como o fluxo gênico aqui discutido, mas detectar as restrições tanto de natureza genética como ecológica às possibilidades de evolução contínua e de aparecimento de novas estratégias adaptativas. As possibilidades de perda de variabilidade genética, causadas pela atividade humana (destruição de habitats) com consequente limitação do potencial evolutivo deve ser um dos eixos dos estudos que se dedicam a desvendar os mistérios da Diversidade Biológica. Para isso, vale a ressalva de que, embora tenhamos um crescente aumento das informações consistentes sobre o nível de variabilidade genética em populações naturais, ainda pouco se sabe sobre as relações entre esta variabilidade e a adaptação e sobrevivência (Sodero-Martins, 1987).

A integração de métodos, sejam genéticos, filogeográficos, ecológicos, etc., nos permitirão compreender de maneira mais abrangente os processos a que populações naturais

estão submetidas, tornando possível estabelecer estratégias mais adequadas para a preservação das diferentes formas de vida.

Para a região neotropical, se sabe muito pouco da diversidade genética e dos padrões e processos relacionados com as histórias evolutivas e demográficas dos MacroFungos; Parte do entendimento sobre a micota e serviços ecossistêmicos dos fungos atravessa a dinâmica e a estrutura genética no sentido de compreender de que forma as forças evolutivas e as pressões ambientais atuantes, no passado e presente, são responsáveis pelo cenário atual. Ao mesmo tempo, acessar os recursos genéticos dos Macrofungos permite uma perspectiva multidirecional visto que é também olhar para as múltiplas relações estabelecidas desses seres com seus hospedeiros, simbioses, e meio ambiente.

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁLVAREZ, I.; WENDEL J.F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol.* 29(3): 417-434.

AOKI, K.; KATO, M.; MURAKAMI, N.2008. Glacial bottleneck and postglacial recolonization of a seed parasitic weevil, *Curculio hilgendorfi*, inferred from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 17, n. 14, p. 3276-3289.

APPEL, D.J.; GORDON, T.R. Relationship among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the Intergenic Spacer Region of the Ribosomal DNA. *MPMI*. v. 9, p. 125-138. 1996.

ARIAS, M.C.; FRANCISCO O.F.; SILVESTRE, F. 2003. O DNA mitocondrial em estudos populacionais evolutivos de meliponíneos - in G. A. R. Melo & I. Alves-dos-Santos, *Apoidea Neotropical: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure*. Editora UNESC, Criciúma, 2003.

AYOADE, J. O. 2004. Introdução à climatologia para os trópicos. 10. ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2004.

BAJAY, M.M. Diversidade e estrutura genética de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. em áreas em processo de restauração florestal e remanescentes de Mata Atlântica. 2014. Piracicaba, 2014. 148 p: il. Tese (Doutorado) - Escola Superior de

Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2014

BALDAUF, S.L.; PALMER, J.D. 1993. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruents evidence form multiple proteins. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 90, p. 11558- 11562. 1993.

BALDWIN B.G.; SANDERSON, M.J; PORTER, J.M; WOJCIECHOWSKI, M.F; CAMPBELL, C.S; DONOGHUE, M.J. 1995 .The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann Missouri Bot Gard. 82(2): 247-277.

BARREDO, D.V. 2015. Vulnerabilidade de Biomas as mudanças climáticas – O caso da Mata atlntica no Estado do Paraná. 343. Tese (Doutorado) UFRJ Programa de Planejamento Energetico, 2015.

BATALHA-FILHO, H.; WALDSCHMIDT, A.M; CAMPOS,L.A.O; TAVARES, M.G; BERNARDES-SALOMÃO, T.M. 2010.Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): Incongruence between morphology and mitochondrial DNA. Apidologie (in press).

BERGAMASCHI, S.; DAWES-GROMADZKI, T. Z.; LUCHETTI, A.; MARINI, M.; MANTOVANI, B. 2007.Molecular taxonomy and phylogenetic relationships among Australian *Nasutitermes* and *Tumulitermes* genera (Isoptera, Nasutitermitinae) inferred from mitochondrial COII and 16S sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, Orlando, v.

45, p. 813–821, 2007.

BLACKWELL, M. 2011. The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98, 426–438.

BLUM, L.E.B.; DIANESE, L. 2011. Padrões de Liberação de urediniósporos e desenvolvimento da ferrugem em jambeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36:845-850. 2001.

BRAND, M.; JARMAN, A.P.; JAN, L.Y.; JAN, Y.N. 1993. Asense is a *Drosophila* neural precursor gene and is capable of initiating sense organ formation. *Development* 119(1): 1-17

BROWN, J.H.; LOMOLINO, M.V. 2006. Glaciação e dinâmica Biogeográfica do Pleistoceno. In *Biogeografia* (2ed), Ribeirão Preto, SP, Funpec (Ed), 177-219.

BROWN, G.C.; SIMPSON, M.V. 1982. Novel features of animal mtDNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 79: 3246-3250

BROWN, A.H.D. 1979. Enzyme polymorphisms in plant populations. *Theoretical Population Biology* 15:1-42

BROWN, A. H. D. 1978 Isozymes, plant populations genetics structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 52, n. 4, p. 145- 157, 1978.

BRUNS, T.D; WHITE, T.J; TAYLOR, J.W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525–564

CAMARGO-JUNIOR, O.A. POTENCIAL DA REPRODUÇÃO SEXUAL NA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. 2008. 132 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Lavras - Minas Gerais, 2008.

CARNAVAL, A. C.; HICKERSAD, C. F. B. 2009. Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian AtlHotspot. *Science*, v. 323, n. 6, p. 785-789, 2009.

CARVALHO, H. C. 1987. Fundamentos de genética e evolução Série Biomédica Autor Carvalho Edição 3 Editora Atheneu, 1987. 556 p., 1987 Num. págs. 556 páginas

CARVALHO, P.E.R. 2004. Pau-Jacaré - *Piptadenia gonoacantha*. Circular Técnica Embrapa

CASA, R.T., REIS, E.M. & ZAMBOLIM, L. 2004. Dispersão vertical e horizontal de conídios de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. *Fitopatologia Brasileira* 29:141-147.

CARUSO, M.M. 1990. O Desmatamento da Ilha de Santa Catarina de 1500 aos dias atuais, 2. ed. rev. Florianópolis, SC: Ed. da UFSC, 1990. 158p.

CASCANTE, A.; QUESADA, M.; LOBO, J.J. & FUCHS, E.A. 2002. Effects of dry Forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology*, 16(1): 137-147.

CAVALARI, M.M. Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola

Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2004.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657

CORREA, T. SHOLLG. 2010. Uma abordagem ecotoxicológica e evolutiva em populações do botocinza *Sotalia guianensis* (Van Béneden, 1875) na costa brasileira. Rio de Janeiro: s.n., 2010. 84 f., il. tab., graf. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro.

CORNER, E.J.H. 1991. Ad Polyporaceas VII. Beihefte zur Nova Hedwigia 101: 1-175.

CROZIER, R. H.; CROZIER, Y. C. 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, Austin, v. 133, p. 97- 1 17, 1993.

CUNNINGHAM, G. 1947. Notes on the classification of the Polyporaceae. *New Zealand Journal of Science and Technology* 28: 238-251.

DAI Y-C. 1999. *Phellinus sensu lato* (Aphylophorales, Hymenochaetaceae) in East Asia. *Acta Botanica Fennica* 166: 1-115.

DAMASCENO, S.K.J.; SOUZA, E.A.; ISHIKAWA, F.H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Phytopathology*, Oxford, v. 155, n. 4, p. 241-247, Apr. 2007.

DOUGLAS, L.J.; HAYMER, D.S. 2001. Ribosomal ITS1 Polymorphisms in *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae). *Entomological Society of America*. v.94 (5), p.726-731, 2001.

GÓES-NETO, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GUERRERO, R.T. 2005. DNA extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas*, 18(2): 19-32

DRECHSLER-SANTOS, E.R.; SANTOS, P.J.P.; GIBERTONI, T.B.; CAVALCANTI, M.A.Q. 2010. Ecological aspects of Hymenochaetaceae in an area of Caatinga (semi-arid) in Northeast Brazil. *Fungal Diversity*. 42(1):71-8.

DRECHSLER-SANTOS, E.R.; ROBLEDO, G. L.; LIMA-JÚNIOR, N.C.; MALOSSO, E.; RECK, M.A.; GIBERTONI, T.B.; CAVALCANTI, M.A.Q.; RAJCHENBERG, M. 2016. *Phellinotus*, a new neotropical genus in the Hymenochaetaceae (Basidiomycota, Hymenochaetales). *Phytotaxa* 261(3):218–239.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. 2010. Fungos: Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*, Ed 4. Longmans Green, Harlow, Essex, UK.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3 .ed.

Brasília: Embrapa,1998. 220p.

FIASSON, J.; NIEMELÄ, T. 1984. The Hymenochaetales: a revision of the European poroid taxa. *Karstenia* 24:

FISHER, M.; BINDER, M. 2004. Species recognition, geographic distribution and host-pathogen relationships: a case study in a group of lignicolous basidiomycetes, *Phellinus* s.l. *Mycologia* 96 (4): 799-811.

FISCHER, M. 1996. On the species complexes within *Phellinus*: *Fomitiporia* revisited. *Mycological Research* 100(12): 1459- 1467

FRANCISCO, F. O. 2002. Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brasi

FRANKHAM, R. 1995a. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, v.29, p.305-327. 1995a.

FRANKS, S.J.; PRATT, P.D.; TSUTSUI, N.D. 2011. The genetic consequences of a demographic bottleneck in an introduced biological control insect. *Conserv Genet* , 12:201–211.

FREELAND, J. R.; MAY, M.; LODGE, R.; CONRAD, K. F. 2003. Genetic diversity and widespread haplotypes in a migratory dragonfly, the common green darner *Anax junius*. *Ecological Entomology*, London, v. 28, p. 413-421, 2003.

FU, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection.

Genetics, Austin, v. 147, n. 2, p. 915-925, 1997

FUTUYMA, D.J. 1998. *Evolutionary Biology*. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 1998. 604p

FUTUYMA, D.J. 1992. *Biologia Evolutiva*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq.

HARDY, G.H. Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 78: 49-50, 1908.

GEISER, D.M.; JIMÉNEZ-GASCO, M.M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T.J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. A 2004. DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, v.110, p. 473-479, 2004

GERCO. Plano Estadual de Gerenciamento Costeiro. Secretaria de Estado de Planejamento e Gestão de Santa Catarina - SPG/SC 2010. Setor 3. Disponível em: www.spg.gov.br/gerco.php. Acesso em: 10 fev. 2017.

GIACHINI, A.J.; HOSAKA, K.; NOUHRA, E.; SPATAFORA, J.; TRAPPE, J.M. 2010. Phylogenetic relationships of the Gomphales based on nuc-25S-rDNA, mit-12S-rDNA, and mit-atp6-DNA combined sequences. *Fungal Biology*, 114: 224-234.

GOEL, S.; RAINA, S.N.; OGIHARA, Y. 2002. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA in the *Phaseolus-Vigna* complex. *Mol Phylogenet Evol* 22(1):1-19

GONÇALVES, G.L.; MARINHO, J.R.; FREITAS, T. R. O. 2009. Genetic structure of sigmodontine rodents (Cricetidae) along an altitudinal gradient of the Atlantic Forest in southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 4, 882 – 885.

GRAZZIOTIN, F. G. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, v. 15, n. 13, p. 3969-82, nov. 2006

GRIFFITHS, A.J.F; WESSLER, S.R; CARROLL, S.B; DOEBLEY, J. 2013. *Introdução à Genética*, décima edição, 2013.

GUERRANT, E.O.; HAVENS, K.; MAUNDER, M. 2004. *Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*. Washington (DC): Island Press.

HAMRICK, J. M., 1992. Estuarine environmental impact assessment using a three-dimensional circulation and transport model. *Estuarine and Coastal Modeling, Proceedings of the 2nd International Conference*, M. L. Spaulding et al, Eds., American Society of Civil Engineers, 292-303.

HANSEN, L.; KNUDSEN, H. 1997. *Nordic Macromycetes*. Vol. 3. Heterobasidioid, aphyllorphoid and gastromycetoid basidiomycetes. Nordsvamp, Copenhagen.

HAWKSWORTH, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95 :641 – 655. Caxias do Sul, EDUCS. 638.

HERINGER, E.P. 1947. *Contribuição ao conhecimento da flora da*

zona da mata de Minas Gerais. Boi. Servo Nac. Pesq. 2:5-187.

HERRMANN, M.L. de P. ROSA, R. de O. 1991. Mapeamento Temático do Município de Florianópolis - Geomorfologia. IPUF/IBGE, Florianópolis

HIBBETT D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111, 509– 547

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol.* 66(4): 411-453

HOY, W. K.; TARTER, C. J.; KOTTKAMP, R. B. 1991. Open schools/healthy schools: Measuring organizational climate. Beverly Hills, CA: Sage.

HOY, M. A. 2003. Nuclear and extranuclear DNA in insects. In: _____. *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications*. San Diego: Elsevier Science, 2003. p. 50-76

HUFBAUER, R. A.; BOGDANOWICZ, S. M.; HARRISON, R. G. 2004. The population genetics of a biological control introduction: mitochondrial DNA and microsatellite variation in native and introduced populations of *Aphidus ervi*, a parasitoid wasp. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 13, p. 337-348, 2004

ICHI, A.I.; INOUE, H. 1995. Cloning, nucleotide sequence, and expression of *tef-1*, the gene encoding translation elongation factor 1 α (EF-1 α) of *Neurospora crassa*. *Jpn. J. Genet.*, v.70, p.273-287. 1995.

JAHN, H. 1981. Die resupinaten Phellinus-Arten in Mitteleuropa mit Hinweisen auf die resupinaten Inonotus-Arten und *Poria expansa* (Desm.) [*Polyporus megaloporus* Pers.]. Bibliotheca

JAIN, S.K. 1982b. Genetic variation in populations: an important tool for ecological report. Paper presented at the 10th R.E.A., Mar del Plata. 1982b.

KAWCHUK, L. M.; LYNCH, D. R.; THOMAS, J.; PENNER, B.; SILLITO, D.; KULCSAR, F. 1996. Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. *American Potato Journal*. v. 73, p. 325-335. 1996.

KEELING, P.J.; INAGAKI, Y. 2004. A class of eukaryotic GTPase with a punctate distribution suggesting multiple functional replacements of translation elongation factor 1 alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101, 15380–15385.

KIM, D. 2006. Fungal heme oxygenases: Functional expression and characterization of Hmx1 from *Saccharomyces cerevisiae* and CaHmx1 from *Candida albicans*. *Biochemistry* 45(49):14772-80

KING, J. L.; T. H. JUKES. 1969. Non-Darwinian evolution: Random fixation of selectively neutral mutations. *Science* 164: 788-798.

KIMURA, M. 1968. The length of time required for a selectively neutral mutant to reach fixation through random frequency drift in a finite population. *Genetical Research* 15: 131.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. 2008. Dictionary of the Fungi. 10 Ed. 10th Edition. CABI Europe. 1-771.

KLABUNDE, G.H.F. 2012. Análise Filogeográfica entre populações de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze em sua área de distribuição Natural. Dissertação de Mestrado. 2012. 85 p. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

KLEIN, R.M. 1979. Ecologia da flora e vegetação do Vale do Itajaí. *Sellowia*, Itajaí, v.31/32, p.9-389, 1979

KRETZER, A.M.; BRUNS, T.D. 1999. Use of *atp6* in Fungal Phylogenetics: An Example from the Boletales. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13(3): 483-492

LARSEN, M.J.; COUBB-POULLE, L.A. 1990. *Phellinus* (Hymenochaetaceae). A survey of the world taxa. *Fungiflora*, 1990.

LARSSON, K.H.; PARMASO, E.; FISCHER, M.; LANGER, E.; NAKASONE, K.K.; REDHEAD, S.A. 2006. Hymenochaetales: a molecular phylogeny for the hymenochaetoid clade. *Mycologia* 98(6):926-936.

LAURENCE, W.F.; COCHRANE, M.A. 2001. Synergistic effects in fragmented landscapes. *Conservation Biology* 15:1488-1535

LAVAGNINI-PIZZO, T. C. História evolutiva de *Drosophila* serido ("cluster" *Drosophila buzzatii*) TESE

LEAL, B.D.Y. 2013. História demografica e estrutura das populações par a especie cactofila *Drosophila meridionalis*. Dissertçai de mestrado apresentada na faculdade de Ribeirão Preto/USP, Genética.

LELLES, J.G.; REIS, M.S.; VALENTE, O.F.; SOUZA, A.P. 1978. Durabilidade de moiros preservados em condições de campo. Rev. da Arvore. Viçosa, 2(I): 27-33

LEVIN, D.A.; KESTER, H.W. 1974. Gene flow in seed plants. *Evolutionary biology*, 7: 139- 220, 1974.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. 2000. Genetic data analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d15). Free program distributed by the authors over the internet from the GDA Home Page at <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/2000>

LEWTER, J. A.; SZALANSKI, A. L.; NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L.; OWENS, C. B.; LUTTRELL, R. G. 2006. Genetic variation within and between strains of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*, Gainesville, v. 89, n. 1, p. 63-68, 2006

LI, J.; ZHAO, F.; CHOI, Y. S.; KIM, I.; SOHN, H. D.; JIN, B. R. 2006. Genetic variation in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) in China inferred from mitochondrial COI gene sequence. *European Journal Branisovska*, v. 103, p. 605-611, 2006.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.

Bioinformatics (Oxford, England) 25: 3023

LENS, B.; REP, M.; THOMMA-BART, P.H.J. 2008. Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science*. v. 64, p. 781-788, 2008.

LOPES, I. F. 2006. Variabilidade genética em populações de *Jabiru myceteria* (Lichtenstein, 1819) e *Myceteria americana* (Linnaeus, 1758) (Aves, Ciconiidae): fluxo gênico e filogeografia. 2006. 106 f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006

LORENZI, H. 1992. Árvores brasileiras; Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 352p. 1992.

LORENZI, H. 2002. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plat populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.15, p.65-95.

LOWE, J.L. 1957. Polyporaceae of North America. The genus *Fomes*. Syracuse, State University College of Forestry, Syracuse University. 97 p.

MALKUS, A.; LINDA, P.; CHANG, P.F.; ZUZGA, S.M.; CHUNG, K.; SHAO, J.; CUNFER, B.M.; ARSENIUK, E.; UENG, P.P. 2006. RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the

second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. *Mycological Research* 110: 1152-1164.

MARQUES, M.C.M.; JOLY, C.A. 2000a. Estrutura e dinâmica de uma população de *Calophyllum brasiliense* Camb. em floresta higrófila do sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 23:107-112.

MATHENY P.B.; WANG, Z.; BINDER, M.; CURTIS, J.M.; LIM, Y.W.; NILSSON, R.H.; HUGHES, K.W.; HOFSTETTER, V.; AMMIRATI, J.F.; SCHOCH, C.L.; LANGER, G.E.; MCLAUGHLIN, D.J.; WILSON, A.W.; FROSLEV, T.; GE, Z.W.; KERRIGAN, R.W.; SLOT, J.C.; VELLINGA, E.C.; LIANG, Z.L.; BARONI, T.J.; FISCHER, M.; HOSAKA, K.; MATSUURA, K.; SEIDL, M.T.; VAURA, J.; HIBBETT, D.S. 2007. Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution* in press.

MATTHIES, D.; BRÄUER, I.; MAIBOM, W. 2004. Population size and the risk of local extinction: empirical evidence from rare plants. *Oikos* 105:481–8.

MAYR, E. 1982. *The ground of biological thought: diversity, evolution and inheritance*. Harvard University Press, Cambridge, 1982.

MEIXNER, M.D.; COSTA, C.; KRYGER, P.E.R.; HATJINA, F.; BOUGA, M.; IVANOVA, E.; BÜCHLER, R. 2010. Conserving diversity and vitality for honey bee breeding *Journal of Apicultural Research* 49(1): 85-92.

MILACH, S.C.K. 1998a. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: UFRGS, 1998a.

MOORE, D.; ROBSON, G.D.; TRINCI, A.P.J. 2011. 21st Century Guidebook to Fungi, First. 627.

MOUSSET, S.; DEROME, N.; VEUILLE, M. 2004. A test of neutrality and constant population size based on the Mismatch Distribution. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, v. 21, n. 4, p. 724-731, 2004.

MUELLER, G.M.; BILLS, G.F; FOSTER, M.S. 2004. Biodiversity of Fungi – Inventory and monitoring methods. Amsterdam: Elsevier, Academic Press

NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

NIELSEN, R. 2001. Statistical tests of selective neutrality in the age of genomics. *Heredity* 86: 641- 647

NYAKAANA, S.; TUMUSIIME, C.; OGUGE, N.; SIEGISMUND, H.R.; ARCTANDER, P.; MUWANIKA, V. 2008. Mitochondrial diversity and population structure of a forest dependent rodent, *Praomys taitae* (Rodentia: Muridae) Heller 1911, in the fragmented forest patches of Taita Hills, Kenya. 2008. *South African Journal of Science* 104

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylo. Evol.* v. 7, p. 103–116, 1997.

O'DONNELL K.; KISTLER H.C.; CIGELNIK E.; PLOETZ R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.

OLIVER, J. C. Population genetic effects of human-mediated plant range expansions on native phytophagous insects. *Oikos*, Copenhagen, v. 112, n. 2, p. 456-463, 2006

PAKENDORF, B. y Stoneking, M.. 2005. "Mitochondrial DNA and human evolution". *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 6: 165-8

PANISSON, E. 2002b. Quantificação de propágulos de *Gibberella zeae* no ar e infecção de anteras em trigo. *Fitopatologia Brasileira*, Fortaleza, v.27, n.5, p.484-488, 2002b.

PESSOA FILHO, M. Identificação de regiões genômicas associadas ao controle de tolerância à seca em variedades tradicionais de arroz de sequeiro (*Oryza sativa* spp. japonica). 2008. 249 (Doutorado). *Biologia Molecular*, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; WAITE, A. N.; MORANDO, M.; YASSUDA, Y.Y.; SITES-JUNIOR, W. R. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2005, 85, 13–26.

POSTINGL,H.; KRAUKS,E.; LITTLE,M.; KEMPF,T. 1981.
Proc. Natl. Acad. Sa. US4, 78, 2757-2761.

RAMOS-ONSINS, S.E.; ROZAS, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2092-210

REID, R.R. 1963. Metamorphic rocks of the northern Tobacco root mountains. Madison County. Montana. *Geological Society of Americans Buletin*, v. 74. P. 293-306.

REID, D.A. 1963. New or interesting records of Australasian Basidiomycetes V Aphylophorales. *Kew Bulletin* 17(2): 267-308.

RODERJAN, C.V.; KUNIYOSHI, Y.S. 1998. Macrozoneamento florístico da Área de Proteção Ambiental (APA -Guaraqueçaba). Curitiba: FUPEF, 1988. 53p. (FUPEF. Série Técnica, 15).

RODRIGUES, P. J. F. P.; NASCIMENTO, M. T. 2006. Fragmentação florestal: breves considerações teóricas sobre efeitos de borda. *Rodriguésia*, v.57, n.1, p.63-74, 2006.

RODRIGUEZ, R.; CULLEN, D.; KURTZMAN, C.; KHACHATOURIANS, G.; HEGEDUS, D. 2003. Molecular methods for discriminating taxa , monitoring diversity.

ROGERS, A R.; HARPENDING, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, v. 9, n. 3, p. 552-69, maio. 1992.

RUIZ-PESINI, E.; MISHMAR, D.; BRANDON, M.; PROCACCIO, V.; WALLACE, D.C. 2004. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303(5655): 223-226.

RYNE, C.; BENSCH, S. 2008. Do anthropogenic transports facilitate stored-product pest moth dispersal? A molecular approach. *Naturwissenschaften*, Berlin, v. 95, n. 2, p. 155-159, 2008.

RYVARDEN, L. 1991. Genera of Polypores. Nomenclature and taxonomy. *Synopsis Fungorum* 5. Oslo: FungiFlora. 363 p.

RYVARDEN L. 2004. Neotropical polypores Part 1. *Synopsis Fungorum* n° 19.

SALVADOR-MONTOYA, C.A. ROBLEDO, R.L. CARDOSO, D. BORBA-SILVA, M.A. FERNANDES, M. DRECHSLER-SANTOS, E.R. *Phellinus piptadeniae* (Hymenochaetales: Hymenochaetaceae): taxonomy and host range of a species with disjunct distribution in South American seasonally dry forests. *Plant Syst Evol.* 2015

SALVADOR-MONTOYA, C. A. 2014. Revisão taxonômica do complexo *Phellinus rimosus* de regiões semiáridas tropicais. 147f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2014

SAMPIETRO, D. A.; MARÍN, P.; IGLESIAS, J.; PRESELLO, D.A.; VATTUONE, M.A.; CATALAN, C. A. N.; GONZALEZ, M. T.; JAEN. 2010. A molecular based strategy for

rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal biology*, v. 114, p. 74–81, 2010.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. 233-242. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHDORF, S.; ROBERT, V.T.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS Early Edition* 109 (16): 1-6

SLATKIN, M, HUDSON, R.R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555–562.

SODERO-MARTINS, P. 1987. ESTRUTURA POPULACIONAL, FLUXO GÊNICO E CONSERVAÇÃO "in situ" IPEF, n.35, p.71-78,

SONG, J.; KAI, B. 2017. Phylogeny, divergence time and historical biogeography of *Laetiporus* (Basidiomycota, Polyporales) CuiEmail author *BMC Evolutionary Biology*

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA e Instituto Nacional De Pesquisas Espaciais, Instituto Socio-Ambiental. 2000. Atlas da evolução dos Remanescentes Florestais e Ecossistemas Associados no Domínio da Mata Atlântica no Período 1995-2000. 2000

STOTZ, H.U.; LONG, S.R. 1999. Expression of the pea (*Pisum*

sativum L.) tubulin gene TubA1 is correlated with cell division activity. *Plant Mol Biol* 41: 601–614

TABARELLI, M.; VICENTE, A. 2004. Conhecimento sobre plantas lenhosas da Caatinga: lacunas geográficas e ecológicas. In: J.M.C. Silva, M.Tabarelli, M.T. Fonseca & L.V. Lins (orgs.). *Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. pp. 101-111. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.

TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

TALAMINI, V.; SOUZA, E A.; POZZA, E.A.; SILVA, G.F.; ISHIKAWA, F.H.; CAMARGO JÚNIOR, O.A. Genetic divergence among and within *Colletotrichum lindemuthianum* races assessed by RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 31, n. 6, p. 545-550, nov./dez. 2006.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596- 1599.

TAYLOR, J.W.; TURRNER, E.; TOWNSEND, J.P.; DETTMAN, J.R.; JACOBSON, D. 2006. Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361, 1947-1963

TEIXEIRA, A.R. 1950. Himenomicetos brasileiros—V Polyporaceae 2. *Bragantia*10: 113–122, 1950

TEMPLETON, A. R.; BOERWINKLE, E.; SING, C. F. 1987. A Cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, Austin, v. 117, n. 2, p. 343-351, 1987.

THEODORO, R. C. 2010. Gênero *Paracoccidioides*: especiação e análise do intein PRP8/ Raquel Cordeiro Theodoro. - Botucatu, 2010 Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.

TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; TORGGLER, S.P. 1995. Isoenzimas: variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto : SBG, 1995.

FEMS Microbiol Rev. 2010 Jan;34(1):59-86. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00196.x.

TORRES-MACHORRO, A.L.; HERNÁNDEZ, R.; CEVALLOS, A.M.; LÓPEZ-VILLASEÑOR, I. Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny.

ZAGONEL, L.B. 2009. Avaliação do impacto das barragens na variabilidade e estruturação genética de *Pimelodus maculatus* LACEPÈDE, 1803 (SILURIFORMES, PIMELODIDAE) do Rio São Francisco. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal do Paraná,

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. 1996. Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Thearaceae) in Korea based on allozyme studies. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, v.37, n.1, p.141-146, 1996

YOUNG, I.; COLEMAN, A. 2004. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. v.30, p.236-242, 2004

WAGNER, T.; FISCHER, M. 2001. Natural groups and a revised system for the European poroid Hymenochaetales (Basidiomycota) supported by nLSU rDNA sequence data. *Mycological Research* 105(7): 773-782.

WAGNER, T.; FISCHER, M. 2002. Proceedings towards a natural classification of the worldwide taxa *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l., and phylogenetic relationships of allied genera.

WEBSTER, J.; WEBER, R.W.S. 2007. *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, New York.

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

WRIGHT J. E.; BLUMENFELD S. N. 1984. New south American species of *Phellinus* (Hymenochaetaceae). *Mycotaxon* 21: 413-425.

WRIGHT, S. Evolution in a Mendelian population. *Anat. Rec.* 44: 287