

# **Fungos basidiomicetas agentes causais de podridões do lenho em árvores na cidade de Lisboa**

**Tatiana Sofia Barroso Valada**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais**

Orientadores: Professora Auxiliar Ana Paula Ferreira Ramos  
Professor Associado com agregação António Manuel Dorotêa Fabião

**Júri:**

Presidente: Doutora Manuela Rodrigues Branco Simões, Professora Auxiliar com agregação  
do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Ana Paula Ferreira Ramos, Professora Auxiliar do Instituto Superior de  
Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Maria Helena Neves Machado, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional  
de Investigação Agrícola e Veterinária





## **Agradecimentos**

Para a realização desta dissertação foram vários os intervenientes que colaboraram direta e indiretamente, os quais merecem o meu reconhecimento e gratidão.

À minha orientadora Doutora Ana Paula Ramos por todo o apoio, paciência, orientação e dedicação a este projeto. Agradeço-lhe imenso esta oportunidade de aumentar os meus conhecimentos na área de patologia vegetal e de me mostrar que a área da investigação é algo bastante entusiasmante.

Ao meu orientador Doutor António Manuel Dorotêa Fabião pela sua paciência e pelos seus conhecimentos em dendrologia e elaboração de trabalhos.

À Engenheira Maria Filomena Caetano pelo acompanhamento de todo o projeto, pela disponibilidade, partilha de conhecimentos e boa disposição.

Ao LPVVA (Laboratório de Patologia Vegetal Veríssimo de Almeida) e a todas os seus colaboradores, pela possibilidade de utilizar as suas instalações e pela disponibilização de alguns isolados da micoteca para completar a coleção deste trabalho. Um agradecimento especial à Camara Municipal de Lisboa, que em conjunto com o LPVVA e no âmbito do Protocolo CML / ISA-LPVVA, me permitiu desenvolver o presente trabalho.

Ao INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrícola e Veterinária), na pessoa da Doutora Helena Machado pela cedência dos isolados da micoteca que permitiram complementar o meu trabalho e ainda à Doutora Joana Henriques pela partilha de conhecimentos relacionados com biologia molecular e análise filogenética.

Aos meus colegas de curso, em especial à Filipa Maia, Bruno Ferreira e Gonçalo Luc, pela ajuda nas saídas de campo, tardes em laboratório ou simplesmente pela companhia enquanto trabalhava.

A todos os meus amigos mais chegados e família pelo apoio.

Um grande obrigado a todos!



## Resumo

As árvores urbanas são elementos estruturais nas cidades atuais, que contribuem para a qualidade de vida dos cidadãos das mais variadas formas. Porém, encontram-se sujeitas a variadas agressões, bióticas e abióticas. Entre os principais patogénios que afetam árvores urbanas, os fungos basidiomicetas lenhícolas destacam-se pelo impacto que podem ter no seu vigor e na sua resistência e estabilidade mecânica. Na maioria dos casos, a deteção destes fungos em árvores adultas ocorre quando os estragos já são irreversíveis, comprometendo a longevidade e o valor ornamental dos exemplares. A identificação destes fungos nem sempre é fácil, quer pela dificuldade em os isolar a partir dos tecidos infetados, quer porque nem sempre a observação das características morfológicas dos basidiomas permite a identificação da espécie em causa.

Com o presente trabalho pretendeu-se contribuir para o esclarecimento da identidade e variabilidade dos fungos agentes causais de podridões do lenho em algumas espécies de árvores urbanas na região de Lisboa. Colheram-se 57 basidiomas, procedeu-se à caracterização cultural e morfológica dos isolados, e obtiveram-se as sequências nucleotídicas das regiões ITS e LSU (28S) do rDNA com o fim de estudar a variabilidade genética dos mesmos.

Entre as espécies de Basidiomycota encontradas destacam-se *Inonotus rickii*, *Ganoderma australe* e *G. resinaceum*. Em Lisboa estes fungos afetam maioritariamente lodãos-bastardos, plátanos e tílias. São também comuns as espécies *I. hispidus*, em plátanos, freixos e sóforas, e *Phellinus torulosus* cujos basidiomas característicos se encontram com frequência no colo e raízes de folhosas e de coníferas. A análise filogenética das sequências nucleotídicas das regiões ITS e LSU do rDNA de isolados identificados como *P. pomaceus* e *P. punctatus* revelou a presença de fungos pertencentes ao complexo *Fomitiporia mediterranea*/*F. pseudopunctata*, bem como variabilidade intraespecífica nas populações de *I. rickii* e *Ganoderma* spp. oriundas da região de Lisboa.

**Palavras-chave:** fungos lenhícolas, risco de rutura, *Inonotus rickii*, *Ganoderma* spp., *Fomitiporia mediterranea*.

## Abstract

### “Basidiomycota fungi associated with wood rot of urban trees in Lisbon”

Urban trees are essential elements in modern cities, providing important benefits to citizens. Nevertheless they are submitted to a serious of abiotic and biotic constraints, among which the lignicolous Basidiomycota fungi are the most important. Wood decaying fungi affect not only trees' stability and mechanical resistance but also their longevity and ornamental value. Timely detection and identification of wood rotting fungi are essential to define the most appropriate management strategies. However, the identification can be time consuming and inaccurate, since the culturing of these fungi is not always possible and conventional identification methods mostly rely on visual analysis of fruit bodies.

In the present study, samples of wood-decay fungi were collected from several species of urban trees in Lisbon. The cultural and morphological characteristics of 57 basidiomes were studied and nucleotidic sequences of the ITS and LSU regions of rDNA were obtained in order to analyze their genetic variability.

Among the Basidiomycota species found *Inonotus rickii*, *Ganoderma australe* and *G. resinaceum* stand out. In Lisbon, these fungi affect mainly hackberry-trees, plane and lime trees. Also very common are *I. hispidus*, in plane trees, ash and Japanese pagoda trees, and *Phellinus torulosus* whose characteristic basidiomes are often found at trunk butt and roots of hardwoods and conifers. The phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the ITS and LSU regions of rDNA allowed to identify isolates previously allocated to *P. pomaceus* and to *P. punctatus* as belonging to the complex *Fomitiporia mediterranea*/*F. pseudopunctata*. Moreover, the analysis revealed the existence of genetic intraspecific variability among the populations of *I. rickii* e *Ganoderma* spp. from Lisbon, stressing the need to deepen the present studies.

**Keywords:** wood decaying fungi, risk of failure, *Inonotus rickii*, *Ganoderma* spp., *Fomitiporia mediterranea*.

## INDICE

<b>Agradecimentos</b>	II
<b>Resumo</b>	III
<b>Abstract</b>	IV
<b>Índice de Figuras</b>	VI
<b>Índice de Quadros</b>	IX
<b>Lista de Abreviaturas</b>	X
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>1.1. Tipos de podridões causados por fungos lenhícolas em árvores urbanas</b>	2
1.1.1. Podridão branca	6
1.1.2. Podridão castanha	8
1.1.3. Podridão branda ou mole	9
<b>1.2. Podridões em árvores em Portugal</b>	10
<b>1.3. Características gerais dos fungos causadores de podridões do lenho em árvores</b>	12
1.3.1. Identificação com base nas características das frutificações e estruturas vegetativas	15
1.3.2. Identificação com base nas características culturais	16
1.3.3. Identificação com base em técnicas bioquímicas	17
1.3.4. Identificação com base em técnicas moleculares	17
<b>1.4. Objetivos do trabalho</b>	19
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	20
<b>2.1. Prospeção de basidiomicetas em árvores na cidade de Lisboa</b>	20
<b>2.2. Identificação dos fungos com base em características macro e microscópicas das frutificações</b>	20
<b>2.3. Obtenção de isolados</b>	21
<b>2.4. Conservação e constituição da coleção de isolados</b>	22
<b>2.5. Influência do meio de cultura e da temperatura no crescimento micelial</b>	27
<b>2.6. Caracterização cultural</b>	27
<b>2.7. Caracterização morfológica</b>	27
<b>2.8. Extração e Quantificação do DNA</b>	28
<b>2.9. Análise da região ITS do DNA ribossomal</b>	29
<b>2.10. Análise da região LSU do DNA ribossomal</b>	29
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	34
<b>3.1. Identificação de fungos lenhícolas com base nas características das frutificações</b>	34
<b>3.2. Influência do meio de cultura no crescimento micelial</b>	39
<b>3.3. Caracterização cultural e morfológica</b>	42
<b>3.4. Caracterização molecular</b>	46
<b>3.4.1. Sequenciação das regiões ITS e LSU do DNA ribossomal dos isolados de <i>Inonotus rickii</i></b>	48
<b>3.4.2. Sequenciação das regiões ITS e LSU do DNA ribossomal dos isolados de <i>Ganoderma</i> spp.</b>	50
<b>3.4.3. Sequenciação das regiões ITS e LSU do DNA ribossomal dos isolados de <i>Phellinus</i> spp.</b>	52
<b>3.4.4. Sequenciação das regiões ITS e LSU do DNA ribossomal dos isolados de <i>Daldinia</i> spp.</b>	54
<b>4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS</b>	57
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	59
<b>ANEXOS</b>	66
Anexo 1	66
Anexo 2	68
Anexo 3	70
Anexo 4	74
Anexo 5	76
Anexo 6	91

## Índice de Figuras

<b>Figura 1 -</b>	Secções transversal (à esquerda) e longitudinal (à direita) de tronco de <i>Schinus terebinthifolius</i> com degradação incipiente do cerne.	3
<b>Figura 2 -</b>	Pernada de <i>Platanus</i> sp. onde são visíveis lesões extensas e lenho exposto apodrecido causados pelo fungo <i>Inonotus hispidus</i> (na base da lesão inferior é possível observar uma frutificação do fungo).	4
<b>Figura 3 -</b>	Podridão branca seletiva em <i>Buxus sempervirens</i> , causada por <i>Fomitiporia</i> sp.	8
<b>Figura 4 -</b>	Frutificações de <i>Inonotus rickii</i> em <i>Celtis australis</i> nas duas fases reprodutivas: anamorfo (à esquerda) e teleomorfo (à direita).	10
<b>Figura 5 -</b>	Basidioma de <i>Ganoderma</i> sp. em tronco de <i>Schinus molle</i> .	11
<b>Figura 6 -</b>	Localização dos pontos de colheita de amostras na região da Grande Lisboa.	20
<b>Figura 7 -</b>	Colheita de massa de clamidósporos de <i>Ptychogaster cubensis</i> na base de <i>Celtis australis</i> (à esquerda) e pormenor de basidioma de <i>Inonotus rickii</i> no tronco da mesma árvore (à direita).	35
<b>Figura 8 -</b>	Basidiomas de <i>Ganoderma australe</i> na base de <i>Apollonias barbujana</i> (à esquerda) e de <i>Ganoderma resinaceum</i> no tronco de um ulmeiro (à direita).	36
<b>Figura 9 -</b>	Basidiomas de <i>Phellinus pomaceus</i> no tronco de <i>Prunus</i> sp. (à esquerda), <i>Phellinus punctatus</i> em ramo de <i>Buxus sempervirens</i> (no centro) e <i>Phellinus torulosus</i> no colo de <i>Acacia</i> sp. (à direita).	38
<b>Figura 10 -</b>	Basidiomas de <i>Inonotus hispidus</i> em tronco de <i>Platanus</i> sp. (à esquerda) e de <i>Laetiporus sulphureus</i> na base de um eucalipto (ao centro). À direita é possível observar os corpos frutíferos de <i>Daldinia concentrica</i> em tronco de <i>Celtis australis</i> .	39
<b>Figura 11 -</b>	Gráficos ilustrativos do crescimento das colónias dos 11 isolados em estudo (sete isolados de <i>Inonotus rickii</i> – B001A, B004B, B005A, B007A, B027B, B032B, B044A; quatro isolados de <i>Ganoderma</i> spp. – B016A, B035A, B053A, B057A), em função do meio de cultura (PDA e MEA, respetivamente) e do tempo de incubação (4, 7, 9 e 10 dias), à temperatura de 25 °C.	40
<b>Figura 12 -</b>	Diâmetro das colónias dos 11 isolados em estudo em função do meio de cultura (PDA e MEA) ao fim de sete dias de incubação, à temperatura de 25 °C.	42
<b>Figura 13 -</b>	Colónias de <i>Inonotus rickii</i> após 10 dias de crescimento em meio de PDA a 25 °C na obscuridade (da esquerda para a direita e de cima para baixo: B001A, B004B, B005A, B007A, B027B e B044A).	43
<b>Figura 14 -</b>	Colónias de <i>Inonotus rickii</i> após 10 dias de crescimento em meio de MEA a 25 °C na obscuridade (da esquerda para a direita e de cima para baixo: B001A, B004B, B005A, B007A, B027B e B032B).	43

<b>Figura 15 -</b>	Colônias de <i>Ganoderma</i> spp. após 10 dias de crescimento em meio de PDA a 25 °C na obscuridade (da esquerda para a direita e de cima para baixo: B016A, B035A, B053A e B057A).	44
<b>Figura 16 -</b>	Colônias de <i>Ganoderma</i> spp. após 10 dias de crescimento em meio de MEA a 25 °C na obscuridade (da esquerda para a direita e de cima para baixo: B016A, B035A, B053A e B057A).	44
<b>Figura 17 -</b>	Clamidósporos e sedas (em baixo, à direita) formados em colônias de <i>Inonotus rickii</i> em meio PDS após 10 dias de incubação a 25 °C (da esquerda para a direita e de cima para baixo, isolados B032B, B027B, B007A e B004B).	45
<b>Figura 18 -</b>	Aspetto de sedas (à esquerda) e de grampos de conexão (à direita) em colônias de <i>Inonotus rickii</i> (isolados B001A e B007A, respectivamente), com 10 dias de crescimento em meio MEA, à temperatura de 25 °C.	45
<b>Figura 19 -</b>	Micélio e esporos do isolado B035A ( <i>G. resinaceum</i> ) em meio PDA (à esquerda), micélio do isolado B016A ( <i>G. australe</i> ) em meio MEA (ao centro) e cristais formados em colônias do isolado B053A ( <i>Ganoderma</i> sp.) em meio MEA (à direita), com 10 dias de crescimento em meio MEA, à temperatura de 25 °C.	46
<b>Figura 20 -</b>	Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região ITS do DNA ribossomal para isolados de <i>Inonotus rickii</i> , obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respectivo valor de “bootstrap”; sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respectiva referência; a sequência de <i>Inocutis tamaricis</i> foi utilizada como “outgroup”.	49
<b>Figura 21 -</b>	Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região LSU do DNA ribossomal para isolados de <i>Inonotus rickii</i> , obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respectivo valor de “bootstrap”; sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respectiva referência; a sequência de <i>Phellinus igniarius</i> foi utilizada como “outgroup”.	50
<b>Figura 22 -</b>	Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região ITS do DNA ribossomal para isolados de <i>Ganoderma</i> spp., obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respectivo valor de “bootstrap”; sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respectiva referência; a sequência de <i>Trametes versicolor</i> foi utilizada como “outgroup”.	51
<b>Figura 23 -</b>	Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região LSU do DNA ribossomal para isolados de <i>Ganoderma</i> spp., obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respectivo valor de “bootstrap”; sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respectiva referência; a sequência de <i>Fomes fasciatus</i> foi utilizada como “outgroup”.	52

- Figura 24** - Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região ITS do DNA ribossomal para isolados de *Phellinus* spp., obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respectivo valor de “bootstrap”; sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respectiva referência; a sequência de *Stereum hirsutum* foi utilizada como “outgroup”. 53
- Figura 25** - Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região LSU do DNA ribossomal para isolados de *Phellinus* spp., obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respectivo valor de “bootstrap”; sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respectiva referência; a sequência de *Fuscoporia ferruginosa* foi utilizada como “outgroup”. 54
- Figura 26** - Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região ITS do DNA ribossomal para isolados de *Daldinia concentrica*, obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respectivo valor de “bootstrap”; sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respectiva referência; a sequência de *Entoleuca mammata* foi utilizada como “outgroup”. 55
- Figura 27** - Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região LSU do DNA ribossomal para isolados de *Daldinia concentrica*, obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respectivo valor de “bootstrap”; sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respectiva referência; a sequência de *Hypoxylon fragiforme* foi utilizada como “outgroup”. 56

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1</b> - Dados de passaporte dos isolados de fungos incluídos no presente estudo, com menção dos isolados mantidos em cultura pura e dos isolados para os quais se obtiveram as sequências nucleotídicas para as regiões ITS e LSU do rDNA	23
<b>Quadro 2</b> - Número de acesso, origem e referências de todas as sequências retiradas do NCBI (isolados de comparação e outgroups) usadas na construção das árvores filogenéticas, para a região ITS e LSU	31
<b>Quadro 3</b> - Lista de géneros ou espécies identificadas com base nos caracteres morfológicos dos basidiomas, respetivos hospedeiros e frequência com que foram encontradas (nº de amostras e de locais)	34
<b>Quadro 4</b> - Resultados da análise de variância ANOVA a dois fatores (isolado e meio), efeitos fixos, $\alpha=0,05$ , para a variável “diâmetro da colónia” (mm) em PDA e MEA, após 7 dias de crescimento à temperatura de 25 °C	40
<b>Quadro 5</b> - Resultados da análise de variância ANOVA a um fator (isolado), efeitos fixos, $\alpha=0,05$ , para a variável “diâmetro da colónia” (mm) em PDA e MEA, após 7 dias de crescimento à temperatura de 25 °C	41
<b>Quadro 6</b> - Distribuição dos isolados de <i>Inonotus rickii</i> e <i>Ganoderma</i> spp. por grupos homogêneos de acordo com teste de comparação de médias (Tukey, 95 % de confiança) realizado para o diâmetro das colónias (mm) em PDA e MEA, respetivamente, após incubação durante sete dias na obscuridade a 25 °C	41
<b>Quadro 7</b> - Lista de isolados para os quais se obtiveram sequências das regiões ITS e LSU do DNA ribossomal, com a respetiva identificação com base nas características dos basidiomas e por confronto com a base de dados pública NCBI, com recursos à ferramenta BLAST	47

## Lista de Abreviaturas

A – adenina

C – citosina

BLAST – “basic local alignment search tool”

CODIT – “compartmentalization of decay in trees”

CWDE – “cell wall degrading enzymes”

DNA – ácido desoxirribonucleico

ddNTP – di-desoxinucleótido

dNTP – desoxinucleótido

ELISA – “enzyme-linked immunorbent”

G – guanina

ISSR – “inter-simple sequence repeat”

ITS – “internal transcribed spacer”

LSU – “large subunit”

MEA – malte de extrato agar

NaClO – hipoclorito de sódio

NCBI – “national center for biotechnology information”

pb – pares de bases

PCR – “polymerase chain reaction”

PDA – gelose de batata dextrosada

RAPD – “random amplification of polymorphic DNA”

RFLP – “restriction fragment length polymorphism”

rDNA – ácido desoxirribonucleico ribossomal

RNA – ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossômico

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

T – timina

# 1. INTRODUÇÃO

Os fungos (Eucaryota:Fungi) são organismos que se caracterizam por ocuparem os mais diversos nichos ecológicos. Estimativas recentes apontam para a existência de 1,5 milhões de espécies de fungos, ainda que menos de metade tenha sido descrita (Nicolotti et al., 2010). Estes organismos estão associados a várias funções ecológicas importantes, como sejam a decomposição de madeira e a formação da manta morta, estando envolvidos na ciclagem de diversos nutrientes. Estabelecem ainda importantes relações com outros organismos, interessantes sob o ponto de vista biológico e ecológico, como são exemplo as associações micorrízicas e os líquenes (Nilsson et al., 2009). Muitas espécies de fungos são descritas como sendo ou saprófitas ou simbiontes, mas existe ainda uma vasta lista de espécies que interagem com plantas, herbáceas ou lenhosas, nelas causando doença.

Entre os fungos fitopatogénicos destacam-se os que são capazes de degradar o lenho de plantas lenhosas, pertencentes na sua maioria à ordem Polyporales (Basidiomycota). Estes fungos, chamados de fungos lenhícolas, são economicamente importantes na medida em que podem ser responsáveis por grandes perdas, tanto em termos de produção de madeira como em madeira já em construção (Gonthier & Nicolotti, 2013). Há ainda problemas de podridões radiculares e do colo que causam prejuízos avultados em pomares de fruteiras e em vinha (Agrios, 2005). Curiosamente, a associação entre fungos e podridões das madeiras foi estabelecida por Robert Hartig, cientista considerado como o fundador da patologia florestal. Em 1874, Hartig provou que ao contrário da crença popular, eram os fungos os agentes causais das podridões (Agrios, 2005). Mais tarde, já no decurso do século XX, diversos estudos vieram a confirmar que as podridões do lenho em árvores vivas são causadas por fungos pertencentes a dois grupos taxonómicos distintos – os basidiomicetas (em maioria) e ainda alguns ascomicetas (Ascomycota).

Os fungos que degradam e apodrecem o lenho possuem a capacidade de produzir um conjunto mais ou menos vasto de enzimas que atacam e despolimerizam moléculas existentes nas paredes das células da madeira (Lonsdale, 1999). Nem todos os fungos segregam o mesmo tipo de enzimas, pelo que nem todos atacam a madeira da mesma forma: dependendo do arsenal de enzimas produzidas e da espécie hospedeira em causa, assim se poderão encontrar podridões brancas, podridões castanhas ou podridões brandas. Para além disso, em resultado desta atividade enzimática é frequente encontrar-se, quer em floresta quer em ambiente urbano, árvores com cavidades mais ou menos extensas nos troncos e pernadas, cujo crescimento, vigor, longevidade, valor ornamental e estabilidade mecânica são afetados. Ainda que a degradação ou a podridão do lenho não signifiquem

necessariamente a morte das árvores, uma vez que o processo de interação entre o agente causal e o seu hospedeiro se pode prolongar por muitos anos, o risco de ocorrerem acidentes com a quebra e queda de árvores tem de ser ponderado, especialmente em zonas urbanas, pela possibilidade de advirem danos para pessoas e bens patrimoniais (Lonsdale, 1999; Terho & Hallaksella, 2005). Como a biologia destes fungos é muito variada, a deteção precoce e a sua identificação são fundamentais para a correta aplicação de métodos de gestão apropriados, visando prevenir a sua presença nas árvores ou para controlar a evolução dos mesmos quando já presentes (Nicolotti et al., 2010; Nagadesi & Arya, 2014).

Apesar dos progressos registados nos últimos anos no que respeita ao conhecimento sobre os fungos lenhícolas, a informação disponível acerca da classificação taxonómica, distribuição geográfica e estratégias de colonização dos basidiomicetas que afetam árvores em cidade, encontra-se ainda dispersa (Nicolotti et al., 2010). Para tal poderão contribuir vários factos: (i) frequentemente estes fungos estão presentes nas árvores durante a maior parte da sua vida sob a forma vegetativa, isto é sob a forma de micélio da fase anamórfica, (ii) os corpos frutíferos da fase sexuada formam-se esporadicamente, por vezes em locais da árvore de difícil acesso, e nem sempre são perceptíveis, (iii) com frequência, quando esses basidiocarpos são detetados encontram-se já em avançado estado de deterioração, o que dificulta ou impossibilita mesmo a sua identificação. Por outro lado, a observação tardia e ocasional de sintomas e de sinais de podridões do lenho leva a que a presença destes fungos seja em muitos casos subestimada ou incorretamente identificada.

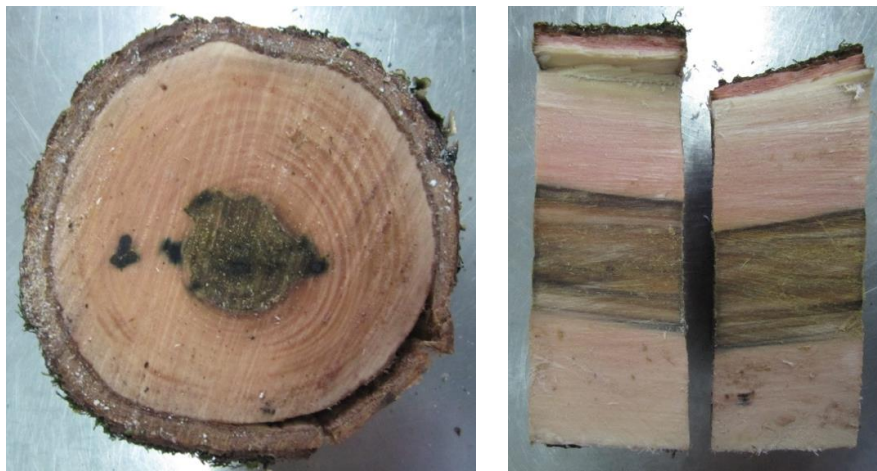
Assiste-se atualmente à utilização de técnicas de diagnóstico com recurso a ferramentas moleculares que permitem a deteção e identificação dos fungos lenhícolas a partir de madeira apodrecida colhida na árvore (Guglielmo et al., 2008; Nicolotti et al., 2010). Estas técnicas representam uma mais-valia para a área da arboricultura por quanto a deteção precoce de determinadas espécies de fungos basidiomicetas associados às árvores urbanas permite antecipar problemas futuros com a condução e manutenção dos espaços verdes nas cidades.

### **1.1. Tipos de podridões causados por fungos lenhícolas em árvores urbanas**

Os estragos causados por fungos lenhícolas prendem-se com o facto de serem organismos quimioorganotróficos com capacidade para degradar, total ou parcialmente, a madeira, causando avultados prejuízos, tanto em termos económicos como paisagísticos. São ainda capazes de produzir um elevado número de esporos, que se propagam com grande facilidade e rapidez, existindo inúmeras espécies que potencialmente podem atacar

árvores vivas, recém-abatidas, armazenadas ou em obra e até mesmo madeira morta (Tavares, 2011).

As podridões podem afetar desde as raízes até aos ramos das árvores, o que nem sempre determina a morte imediata do hospedeiro. Nas árvores vivas grande parte da podridão encontra-se no cerne (Fig. 1), zona que não possui capacidade de respostas ativas apesar de ter uma maior resistência que o borne, relacionada com a presença de taninos, resinas, fenóis, entre outras substâncias. O borne também pode ser colonizado, isto se estivermos perante as condições favoráveis de crescimento do fungo, embora este já seja capaz de responder ativamente perante a invasão (Lonsdale, 1999).



**Figura 1.** Secções transversal (à esquerda) e longitudinal (à direita) de tronco de *Schinus terebinthifolius* com degradação incipiente do cerne.

A zona de ataque vai variar consoante o fungo em questão mas frequentemente o modo de atuar dos fungos lenhícolas passa pela penetração na árvore a partir de lesões no ritidoma e de cortes de podas mal efetuados. Os fungos que atacam a partir da copa da árvore colonizam o cerne e não costumam estender-se ao tronco e sistema radicular, pelo que raramente existe transmissão entre árvores adjacentes ou para a próxima geração, a partir da rebentação do cepo. Já os fungos que colonizam as raízes ou o colo podem causar problemas graves em povoamentos gerados por rebentação (Lonsdale, 1999). Nestas situações ocorre a formação de grandes cavidades, lenho exposto e frutificações. A presença de frutificações no exterior da árvore torna evidente a existência de uma podridão, ainda que não haja uma relação direta entre a quantidade de frutificações e a extensão da podridão, já que para o mesmo fungo a velocidade de colonização do lenho varia com a espécie da árvore atacada e com as condições de temperatura e humidade (Lonsdale, 1999; Schwarze et al., 2000).

A madeira colonizada por fungos lenhícolas pode ficar ensopada, esponjosa, fibrosa, em flocos ou em cubos. Pode adquirir várias cores, castanha, branca, amarela ou

avermelhada, vários metros acima ou abaixo de onde se encontra a frutificação. Em lesões grandes e abertas, especialmente em folhosas, a descoloração e degradação do lenho podem continuar lentamente ocupando o borne e estendendo-se até ao cerne. O processo de desenvolvimento da podridão ocorre em coluna, podendo estender-se acima ou abaixo da área onde os organismos pioneiros e os fungos entraram ou onde se formaram as frutificações (Schwarze et al., 2000). A árvore, por sua vez, responde à infecção, tentando compartimentar e impedir a progressão da colonização pelo fungo, segundo o modelo de compartimentação conhecido por CODIT ("compartmentalization of decay in trees") (Shigo, 1989). Se a resposta da árvore não for suficientemente rápida ou eficiente, o fungo poderá colonizar os tecidos lenhosos radial e verticalmente, quer no cerne quer no borne. Alguns dos fungos lenhícolas que atacam árvores urbanas são muito agressivos e podem ainda levar à morte do câmbio e do ritidoma, quer antes, quer durante o processo de degradação e apodrecimento do lenho (Fig. 2) (Gonthier & Nicolotti, 2013).



**Figura 2.** Pernada de *Platanus* sp. onde são visíveis lesões extensas e lenho exposto apodrecido causados pelo fungo *Inonotus hispidus* (na base da lesão inferior é possível observar uma frutificação do fungo).

O ataque deste tipo de fungos compromete não só a estabilidade e resistência mecânica da árvore, como também a sua longevidade e o seu valor ornamental, fatores que devem ser tidos em conta em meio urbano (Caetano & Ramos, 2009). Uma deteção atempada de árvores em risco de entrar em rutura é alcançada através de uma inspeção cuidadosa dos sintomas e sinais de podridão e de defeitos estruturais na árvore. Atualmente esta avaliação é feita segundo a metodologia definida por Mattheck & Breloer (1994), podendo mesmo ser complementada com recurso a instrumentos como o resistógrafo e o tomógrafo, que permitem, por extrapolação, calcular a percentagem de lenho degradado

num determinado ponto da árvore (Schwarze et al., 2000). Contudo, esta abordagem raramente permite o diagnóstico do agente causal da podridão. Devido à biologia e ecologia variada das diferentes podridões, o conhecimento dos fungos lenhícolas envolvidos é importante para prever a extensão da infecção e potenciais riscos de queda (Nicolotti et al., 2010).

Considera-se que existe podridão da madeira quando se observa a degradação ou decomposição dos principais constituintes químicos do lenho, devido à atividade enzimática gerada por diversos microrganismos. O desenvolvimento de uma podridão gera alterações químicas e estruturais na madeira, nomeadamente nas paredes celulares, que resultam em modificações nas propriedades mecânicas das células e, por consequência da árvore.

A degradação da madeira pode dar-se de diversas formas, consoante o tipo de madeira (isto é, a espécie hospedeiro), o agente patogénico envolvido e as condições locais em que se encontra a árvore (Lonsdale, 1999). A classificação mais comum dos tipos de podridões refere-se ao aspeto que a madeira adquire nas etapas finais do processo de degradação enzimática que ocorre nas células lenhosas: cor esbranquiçada, acastanhada, etc., dando origem à separação das podridões em podridões brancas, podridões castanhas e podridões brandas ou moles (Schwarze et al., 2000). Quer a coloração quer as características mecânicas da madeira degradada são consequência do processo de colonização dos tecidos da árvore pelo fungo, e do tipo de enzimas envolvidas.

Os fungos capazes de degradar a madeira segregam enzimas extracelulares, exoenzimas, capazes de digerir moléculas complexas e de penetrar diretamente nas paredes celulares das plantas (Lucas, 1998). Estas enzimas de degradação da parede celular (CWDE “cell wall degrading enzymes”) estão associadas à patogenicidade da maior parte dos agentes causais de doenças em plantas e, por sua vez, a grandes perdas de rendimento em madeira (Wood & Jellis, 1984). É essencial conhecer a estrutura da parede celular, que é extremamente complexa, para compreender melhor o comportamento das CWDE. As paredes celulares das células vegetais são maioritariamente constituídas por celulose, hemicelulose e lenhina. De entre estes componentes, a celulose é a mais consistente estruturalmente, variando muito pouco entre os vários tipos de madeira. É um polímero de cadeia longa composto por um só monómero, a glucose, e as suas microfibrilas dão à parede força mecânica. Apresenta uma coloração clara e possui uma grande afinidade com a água. Já as hemiceluloses e a lenhina variam em composição e quantidade, tanto nas folhosas como nas coníferas. As primeiras são polissacarídeos, que se encontram intercaladas com as microfibrilas de celulose, dando elasticidade à madeira. A lenhina é bastante diferente quer da celulose quer das hemiceluloses pois é uma macromolécula tridimensional amorfa que confere à madeira grande rigidez e resistência à biodegradação (Pegg & Ayres, 1987; Nagadesi & Arya, 2014). As CWDE podem ter múltiplas formas, o que

confere flexibilidade a um potencial agente patogénico. É frequente que várias formas segregadas de CWDE, diferindo tanto no ponto isoelétrico como no peso molecular, ataquem quer o mesmo substrato quer substratos distintos (Pegg & Ayres, 1987). Nas etapas iniciais de podridão a madeira perde peso e a capacidade de suportar esforços de tração, sem que sejam visíveis quaisquer sintomas de descoloração ou degradação (Wilcox, 1978).

Segundo Lonsdale (1999) o processo de degradação do lenho de uma árvore é um fenómeno que pode levar muitos anos a evoluir, sendo possível identificar quatro fases distintas, com repercussões em termos de sintomas na árvore: (i) *Degradação incipiente do lenho* – nesta fase pode ou não haver coloração da madeira; ocorre espessamento das paredes celulares, o que resulta em menor capacidade para suportar esforços de tração; mesmo antes de a podridão ser óbvia pode ocorrer alguma perda de estabilidade; (ii) *Degradação inicial do lenho* – a degradação é detetável embora não seja óbvia; registam-se alterações ligeiras na coloração, na textura e na capacidade de suportar esforços de tração; regista-se já alguma perda de peso e de estabilidade; (iii) *Degradação intermédia do lenho* – degradação óbvia, embora o essencial da estrutura da madeira permaneça intacta (isto é, as paredes celulares mantêm a sua forma); (iv) *Degradação avançada do lenho* – a estrutura da madeira é totalmente destruída, apresenta aparência fibrosa ou pulverulenta, consoante os compostos degradados enzimaticamente, e perda total para suportar esforços de tração e compressão.

#### 1.1.1. Podridão branca

A podridão branca é particularmente abundante em ecossistemas florestais, sendo a forma mais comum de podridão do lenho encontrada em árvores vivas (Schwarze et al., 2000). É causada sobretudo por fungos Basidiomycota, mas também por ascomicetas, que produzem inicialmente lenhinases que atacam a lenhina e mais tarde, no decurso do processo de colonização, enzimas que vão degradar de forma diferenciada as celuloses e hemiceluloses das paredes celulares.

A madeira de folhosas é a mais suscetível ao ataque destes fungos, tanto pelo maior conteúdo em lenhina como pelas suas hemiceluloses (Schwarze et al., 2000). Existem contudo algumas coníferas afetadas por podridões brancas (por exemplo *Pinus* spp. por *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm.). Em árvores em pé esta podridão é associada à presença de feridas e de cancrios. Em função da espécie fúngica envolvida e das respetivas enzimas excretadas, as podridões brancas podem ser de dois tipos: podridões brancas seletivas e podridões brancas simultâneas (Worrall et al., 1997).

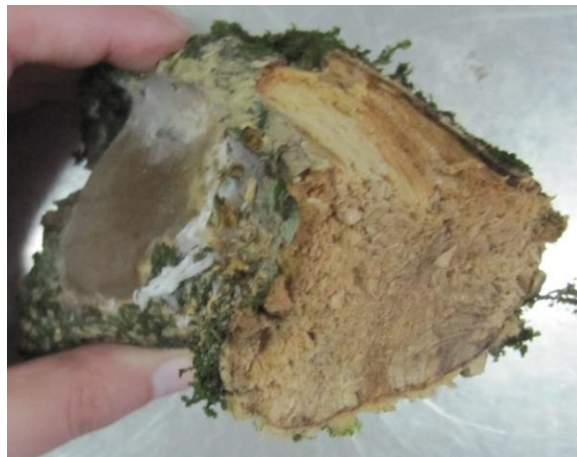
Na **podridão branca seletiva**, também designada deslinhificação seletiva, que se encontra quer em coníferas quer em folhosas, a degradação da parede celular centra-se na lenhina e nas hemiceluloses, causando a dissolução da lamela média e, em fases mais avançadas, também pode atingir a celulose (Worrall et al., 1997; Schwarze et al., 2000). A capacidade da madeira para suportar esforços de tração não é alterada e segundo Schwarze et al. (2000) até pode, em certos casos, registar um ligeiro aumento. Como resultado, a madeira torna-se mais suave, com consistência fibrosa, por vezes alveolar, e coloração esbranquiçada (Fig. 3). Os fungos que causam podridão branca seletiva diminuem a capacidade da árvore para suportar esforços de compressão, e portanto o seu próprio peso, ainda que a madeira se torne mais elástica, suportando deformações mais acentuadas devido à permanência de celulose na parede celular. Árvores afetadas por este tipo de fungos exibem lenho de reação nas zonas apodrecidas, rugas de compressão e deformações que mais não são do que uma resposta mecânica ao stresse suplementar que se faz sentir nos locais onde a dissipação de esforços é afetada (Mattheck & Breloer, 1994; Schwarze et al., 2000; Passola, 2011). O fungo *Porodaedalea pini* (Brot.) Murrill (sin. *Phellinus pini* (Brot.) A. Ames) é responsável pela deslinhificação seletiva da madeira em pinheiros com mais de 15 anos de idade, sendo conhecido como o agente causal do cardimento ou ardido do pinheiro (van Halder, 2002). Também as podridões causadas por *Ganoderma* spp. e *Inonotus hispidus* (Bull.) P. Karst, em folhosas, e por *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s.l. em resinosas, são do tipo podridão branca seletiva (Schwarze et al., 2000).

Os fungos que causam **podridão branca simultânea** degradam a celulose e a lenhina a uma taxa muito semelhante, causando erosão desde a superfície do lúmen das células (Worrall et al., 1997). Este tipo de podridão afeta mais frequentemente folhosas e faz com que a madeira fique com uma coloração esbranquiçada, consistência frágil semelhante a giz, aspeto cúbico, fratura rígida e redução da capacidade de suportar flexão (Schwarze et al., 2000). Como tanto a componente elástica como a componente rígida são degradadas, a árvore não tem capacidade para produzir lenho de reação e portanto não apresenta deformações. Nestas árvores a presença de defeitos externos como deformações e rugas de compressão é bastante reduzida, ou mesmo inexistente, tornando muito difícil a sua deteção a menos que se observem cavidades abertas (Mattheck & Breloer, 1994; Schwarze et al., 2000). O fungo *Fomes fomentarius* (L.) Fr., muito frequente em ambiente urbano em árvores da família Salicaceae, causa podridão branca simultânea especialmente em choupos (Intini, 1990; Schwarze et al., 2000; Passola, 2011).

Segundo Worrall et al. (1997) as duas formas de podridão branca podem ser causadas por um mesmo fungo em diferentes etapas de colonização da madeira. É o caso de *Ganoderma cupreolaccatum* (Kalchbr.) Z. Igmándy (sin. *G. pfeifferi* Bres.) em faias que,

nas fases iniciais de colonização da madeira, causa podridão seletiva e à medida que progride passa a degradar todos os componentes das paredes celulares (Schwarze et al., 2000).

Por fim, alguns ascomicetas causam uma podridão branca de progressão bastante lenta, com a presença de linhas negras irregulares no interior e circundando a madeira apodrecida, tanto em folhosas em pé como em segmentos cortados (Schwarze et al., 2000). Por exemplo a espécie *Rosellinia necatrix* Berl. ex Prill. é agente causal de podridão branca seletiva em diversas espécies fruteiras (Agris, 2005).



**Figura 3.** Podridão branca seletiva em *Buxus sempervirens*, causada por *Fomitiporia* sp.

### 1.1.2. Podridão castanha

Os fungos causadores de podridão castanha são muito menos frequentes do que os causadores de podridões brancas, afetam especialmente coníferas e são basidiomicetas da família Polyporaceae (Schwarze et al., 2000). Curiosamente, os fungos causadores de podridão castanha constituem menos de 10 % das centenas de espécies de basidiomicetas descritas como associadas a madeira (Ryvarden & Gilbertson, 1993-1994).

Estes fungos produzem quase exclusivamente celulasas que vão digerir quer a celulose quer a hemicelulose (Singh & Singh, 2014). Estes dois componentes representam 70 % do peso seco da madeira e a sua degradação faz com que os tecidos afetados adquiram uma coloração castanha devido à presença de moléculas de lenhina alteradas. A lenhina, que também pode ser degradada até certo ponto, é deixada como um resíduo nas paredes celulares degradadas, pelo que os tecidos apresentam maior rigidez, por perda da componente elástica das células, e a sua capacidade de suportar esforços de tração é drasticamente afetada (Passola, 2011; Singh & Singh, 2014). Esta madeira apresenta uma dureza muito elevada, que se mantém por muito tempo, fazendo com que as células vivas não reajam aos esforços mecânicos; a sua textura é cúbica, de consistência frágil,

quebradiça e pulverulenta ao ser esmagada. Em geral árvores afetadas por este tipo de podridão não exibem sintomas externos que permitam diagnosticar a sua presença (Mattheck & Breloer, 1994; Schwarze et al., 2000; Passola, 2011).

Em ambiente urbano é frequente a presença de *Rigidoporus ulmarius* (Sowerby) Imazeki em freixos e tílias, causando podridão castanha no colo e raízes (Passola, 2011).

### 1.1.3. Podridão branda ou mole

De acordo com Passola (2011) este tipo de podridão é pouco usual na Península Ibérica, ocorrendo sobretudo em zonas de clima mais atlântico ou de montanha. Contudo encontra-se bastante presente na natureza (Singh & Singh, 2014). De entre os tipos de podridões conhecidos este é o menos estudado. Macroscopicamente é difícil de detetar exceto em estados bastante avançados, apresentando uma capa branda à superfície geralmente descorada e levemente erosionada, podendo abrir fissuras em madeira seca (Tavares, 2011).

Os fungos que causam esta podridão são ascomicetas mas também se conhecem algumas espécies de basidiomicetas que de forma pontual podem induzir este tipo de podridão. Entre as espécies de ascomicetas destacam-se as pertencentes ao género *Kretzschmaria* (sin. *Ustulina*) (Passola, 2011). Todos os componentes da parede celular podem ser degradados durante a podridão branda mas há preferência pelas celuloses e hemiceluloses especialmente nas folhosas (Worrall et al., 1997). São reconhecidos dois tipos diferentes de podridão de acordo com o tipo e quantidade relativa de enzimas produzidas pelo fungo envolvido. A podridão do Tipo 1 é a que tem sido mais estudada e pode degradar celulose, hemicelulose e mesmo lenhina até certo ponto. É caracterizada anatomicamente por cadeias de cavidades longitudinais com pontas cónicas, orientadas com as microfibrilas da celulose, que se encontram na camada S2 da parede celular. Já a podridão do Tipo 2 causa erosão da superfície do lúmen, similar à podridão branca simultânea, mas pouco se sabe sobre esta (Worrall et al., 1997; Singh & Singh, 2014).

No geral a madeira afetada por esta podridão fica com uma coloração entre o branco e o castanho, aparência alveolar, relativamente dura e com consistência quebradiça; esta madeira tem pouca capacidade para suportar esforços de tração e uma boa resistência à compressão (Passola, 2011).

A podridão causada por *Kretzschmaria deusta* (Hoffm.) P.M.D. Martin é uma das podridões mais preocupantes em árvores urbanas, que afeta sobretudo o sistema radicular e o colo de inúmeras espécies de folhosas (Passola, 2011). A podridão causada por este fungo é de difícil deteção com recurso a resistógrafo ou a tomografia, e as frutificações geralmente formam-se quando a degradação é já muito extensa (Schwarze et al., 2000).

Entre os basidiomicetas responsáveis por podridões brandas importa referir *Inonotus hispidus*, *Ganoderma adpersum* (Schulzer) Donk e *Meripilus giganteus* (Pers.) P. Karst que nas zonas de confronto com as barreiras de compartimentação causam podridão alveolar do tipo podridão branda (Schwarze et al., 2000; Passola, 2011).

## 1.2. Podridões em árvores urbanas em Portugal

Em relação a fungos que atacam a vegetação arbórea em Portugal, a maior parte da informação existente remete-nos para espécies lenhícolas que atacam povoamentos, como *Heterobasidion annosum*, que causa podridão do cerne em *Pinus* sp., e também algumas espécies de *Armillaria* (ICNF, 2013). Pouco tem sido estudado e discutido sobre espécies que atacam árvores urbanas, mas o mesmo não acontece noutros países europeus como Espanha e Itália, que estão mais avançados neste campo.

O género *Inonotus* é referenciado nestes três países europeus como o responsável pela podridão branca do cerne, encontrando-se descritas as espécies *Inonotus hispidus* e *Inonotus rickii* (Pat.) D.A. Reid. (anam. *Ptychogaster cubensis* Pat.) (Fig. 4) (Intini, 1990; Passola, 2011; Melo et al., 2002). Esta última espécie tem uma vasta distribuição pelos trópicos e subtropicais, onde parece limitado a zonas urbanas, sendo mais raro de encontrar em zonas temperadas. Foi detetada em Portugal pela primeira vez em *Celtis australis* L. no ano 2000 (Ramos et al., 2008).



**Figura 4.** Frutificações de *Inonotus rickii* em *Celtis australis* nas duas fases reprodutivas: anamorfo (à esquerda) e teleomorfo (à direita).

Os basidiomicetas do género *Ganoderma* também têm algum relevo no que toca a árvores em meio urbano (Fig. 5). Espécies como *G. adspersum*, *G. applanatum* (Pers.) Pat., *G. australe* (Pers.) Pat., *G. resinaceum* Boud., foram identificadas como causadoras de podridão branca em Espanha e Itália (Intini, 1990; Passola, 2011), já em Portugal pouco se sabe sobre a distribuição deste género mas é evidente a sua disseminação na região de Lisboa (Caetano, informação pessoal). São causadoras de podridão branca seletiva ou simultânea (consoante as espécies e os hospedeiros em que se encontram), podendo por vezes causar também podridão mole; estão ainda associadas a cancrs e deformações na forma do tronco. As folhosas são as árvores mais atacadas e, em zonas temperadas, a podridão é limitada às raízes, colo e zonas mais baixas do tronco. A presença destes fungos é facilmente detetada pela existência de frutificações, isoladas ou em grupo, perenes ou anuais (Passola, 2011; Schwarze & Ferner, 2012).



**Figura 5.** Basidioma de *Ganoderma* sp. em tronco de *Schinus molle*.

Temos também o género *Phellinus* que tem vindo a aparecer recorrentemente em meio urbano, com as seguintes espécies a serem descritas: *P. pomaceus* (Pers.) Maire, *P. punctatus* (P. Karst.) Pilát, *P. resinaceus* Kotl. & Pouzar e *P. torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin. De acordo com a bibliografia mais recente (Decock et al., 2007) a maioria dos fungos descritos como *Phellinus* sp. foram segregados no género *Fomitiporia*.

Segundo Ramos et al. (2011) entre os fungos lenhícolas mais frequentemente assinalados em árvores monumentais estão *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer em *Celtis australis*, e *Populus* spp., *Coniophora puteana* (Schumach.) P. Karst. em *Cupressus lusitanica* Miller e *C. sempervirens* L., *G. australe* em *Fagus sylvatica* L., *Persea indica* (L.) Spreng., *Quercus rubra* L., e *Tilia* sp. L., *G. resinaceum* em *C. australis*, *Inonotus hispidus* em *Platanus* spp., *I. rickii* em *C. australis*, *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill em *Eucalyptus* spp., *Lopharia cinerascens* (Schwein.) G. Cunn. em *Tipuana tipu* (Benth.) Kuntze, *Meripilus*

*giganteus* em *Fagus sylvatica* e *Liriodendron tulipifera* L., *Perenniporia ochroleuca* (Berk.) Ryvarden em *Metrosideros excelsa* Gaertner, *Phellinus pini* em *Pinus pinea*, *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin em *Eucalyptus* spp., *Rigidoporus ulmarius* (Sowerby) Imazeki em *Aesculus hippocastanum* L..

### **1.3. Características gerais dos fungos causadores de podridões do lenho em árvores**

O Reino Fungi ou Mycota encontra-se integrado no Domínio Eukaryota e apresenta quatro divisões: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota (Crous et al., 2009). Este reino admite todos os fungos verdadeiros, ou superiores, enquanto que os pseudofungos, ou fungos inferiores, se encontram agrupados no reino Chromista (Agrios, 2005).

Todas as plantas são afetadas ao longo do seu ciclo de vida por algum tipo de fungo e cada espécie fúngica pode parasitar um ou vários hospedeiros. Estes organismos, quimioorganotróficos, são bem-sucedidos devido à sua capacidade de penetrar, colonizar e reproduzir-se à custa dos tecidos da planta hospedeira. Alguns fungos, como os agentes causais de ferrugens e oídios, são biotróficos, isto é, apenas conseguem crescer e multiplicar-se em tecidos vivos e por isso, são também chamados de parasitas obrigatórios. Por oposição, outros fungos cumprem a maior parte do seu ciclo de vida associados a tecidos mortos (necrotróficos), sendo designados de parasitas facultativos, uma vez que podem em determinadas condições infetar plantas vivas. Da mesma forma, existem ainda fungos que vivem a maior parte da sua vida parasitando tecidos vivos, mas que podem crescer saprofiticamente em matéria orgânica em decomposição, sendo assim designados de saprófitas facultativos (Agrios, 2005; Batt & Tortorello, 2014).

A maioria dos fungos germina a partir de esporos, formando células filamentosas que se estendem por crescimento apical, denominadas hifas. Estas podem ser septadas, em células cheias de protoplasma, ou não septadas, e com longos tubos com protoplasma (Lucas et al., 1985; Lucas, 1998). Tanto o seu diâmetro (entre 0,500 µm a mais de 100 µm) como o seu comprimento (alguns µm a vários metros) são muito variáveis. Ao se agregarem, as hifas passam a constituir o micélio, que pode ser contínuo e com filamentos plurinucleados (micélio cenocítico), ou apresentar septos que vão delimitar células com uma constituição uni-, bi- ou plurinucleada (micélio septado). A partir de uma única célula podemos cultivar uma rede de hifas interligadas denominada de colónia. As hifas podem modificar-se para realizar atividades ligadas ao crescimento, sobrevivência e/ou reprodução. No decurso do seu ciclo de vida a maioria dos fungos produz esporos de natureza assexuada, havendo espécies que diferenciam ainda esporos sexuados. A identificação

do(s) tipo(s) de esporos e a sua organização em frutificações são fundamentais para a identificação dos fungos com base em critérios morfológicos (Crous et al., 2009).

Os fungos basidiomicetas são de longe o mais numeroso e principal grupo de organismos responsáveis pela degradação da madeira, e conseqüentemente por causarem podridões em árvores em pé. A classificação e a taxonomia destes fungos basidiomicetas é extremamente complexa, e a maioria das “antigas” espécies de fungos associadas a podridões têm vindo a ser redescritas ou renomeadas nas duas últimas décadas, no âmbito das mais recentes regras da taxonomia micológica.

Taxonomicamente os basidiomicetas lenhícolas enquadram-se nas ordens Agaricales, Hymenochaetales, Polyporales e Russulales (Nicolotti et al., 2010). Estes fungos são conhecidos por diferenciarem frutificações do tipo basidiomas ou basidiocarpos que vulgarmente são denominadas carpóforos (para Hymenochaetales e Polyporales) ou ainda cogumelos (em Agaricales e Russulales). Nos fungos basidiomicetas o principal tipo de esporos são os basidiósporos. Estes esporos são de natureza sexuada (resultam de uma divisão meiótica) e formam-se em esporóforos denominados basídios, que por sua vez se dispõem em tubos ou poros, lâminas ou lamelas e ainda agulhas na estrutura denominada himénio. O conjunto, ou basidiocarpo, pode ter forma, tamanho e aparência muito variáveis. Os basidiomas têm como função produzir e disseminar os basidiósporos que ao germinarem estabelecem um novo micélio, geneticamente diferente do responsável pela sua produção. A reprodução assexuada também pode ocorrer ao longo do ciclo de vida destes fungos, por fragmentação do micélio ou através da formação de esporos assexuados. Estes esporos, ou conídios, formam-se a partir de hifas especializadas dispostas em estruturas mais ou menos complexas, e da sua germinação resulta um ou mais indivíduos geneticamente idênticos ao que os originou. O processo de formação dos basidiomas é ainda em grande parte desconhecido, sendo a maioria da informação conhecida proveniente de estudos laboratoriais que incidem sobre um número relativamente reduzido de espécies (Intini, 1990).

Um segundo grupo de fungos, pertencentes à divisão Ascomycota, é capaz de degradar o lenho de espécies lenhosas e causar podridões em árvores em cidade. Estes fungos são mais conhecidos como agentes causais de doenças das folhas ou de cancos em árvores urbanas. Contudo, algumas espécies são capazes de degradar o lenho de árvores, causando diversos tipos de podridões. É por exemplo o caso de *Daldinia concentrica* (Bolton) Ces. & De Not. e de *Kretzschmaria* (sin. *Ustulina*) em diversas espécies de folhosas, e ainda de *Rhizina undulata* Fr. em *Pinus* spp. e em *Quercus* spp., fungos que causam podridões radiculares e do colo, com forte impacto em termos de estabilidade mecânica (Passola, 2011). Os ascomicetas reproduzem-se sexuadamente através da formação de ascósporos em ascos. Os ascos organizam-se em estruturas mais ou menos

complexas, os ascocarpos, em geral menos complexas e mais discretas do que os basidiomas dos basidiomicetas. Da mesma forma que os basidiomicetas, podem reproduzir-se assexuadamente, originando esporos ou conídios que disseminados com a ajuda do vento e da chuva são fonte de novas infecções (Agris, 2005). Dada a menor importância dos ascomicetas como agentes causais de podridões do lenho em árvores em cidade, no presente trabalho optou-se por dar um maior relevo aos aspetos que respeitam os fungos lenhícolas basidiomicetas, nomeadamente no que diz respeito às técnicas de identificação (capítulos 1.3.1., 1.3.2., 1.3.3. e 1.3.4.).

Apesar de ser escasso o conhecimento acerca dos fatores que induzem a formação das estruturas reprodutoras, sobretudo dos fungos basidiomicetas, a luz parece ser um dos parâmetros mais importantes no processo de frutificação. Tanto em condições controladas como em condições de campo, a alternância de períodos de luz e escuridão surge como um dos sinais necessários à indução da diferenciação dos basidiomas (Lonsdale, 1999). Ainda segundo Intini (1990), outros fatores relevantes neste processo são as alterações na temperatura e na humidade ambientais. Na natureza os fatores anteriormente apontados apresentam flutuações características (em função das estações do ano, por exemplo), o que pode contribuir para as diferentes épocas de frutificação destes macrofungos.

A maioria dos basidiomicetas (e ascomicetas) inicia o seu ciclo de vida quando os esporos microscópicos são libertados a partir dos poros ou das lamelas do basidioma ou de outros tipos de estruturas de frutificação (por ex. peritecas no caso de alguns ascomicetas). Os esporos são produzidos em enormes quantidades e são primariamente dispersos por ação do vento. A maioria dos fungos lenhícolas tem capacidade para sobreviver saprofiticamente em árvores mortas, toiças e raízes deixadas no solo, o que lhes confere a possibilidade de sobreviver por longos períodos mesmo após a morte do hospedeiro (Lonsdale, 1999). As frutificações que se diferenciam em árvores mortas ou em toiças são uma importante fonte de inóculo, que poderá dar início a novas infeções em novos indivíduos. A remoção de basidiomas e de ascocarpos que se tenham formado quer em árvores vivas quer em material morto, contribui para diminuir a produção de esporos ainda que não permita reduzir significativamente a presença da podridão no seio da população do hospedeiro (Gonthier & Nicolotti, 2013).

A infeção de novos hospedeiros acontece maioritariamente através de lenho recém-lesionado, ainda que também possam ocorrer infeções a partir dos ramos e raminhos recém-abrolhados ou ainda por contacto através das raízes. Após o contacto com os tecidos do hospedeiro o fungo dará início ao processo de colonização, à custa da absorção dos produtos derivados do processo de degradação enzimática seletiva dos componentes das paredes celulares, tal como anteriormente explicado (cap. 1.1.).

O aparecimento das estruturas frutíferas do agente causal da podridão revela o fecho do ciclo de vida, ainda que em muitas situações a frequência com que os basidiomas se formam seja muito baixa, ou até mesmo nula, levando a que tenha de se recorrer à observação de outros indicadores para diagnosticar a presença de podridões internas em árvores. Cavidades, fissuras e protuberâncias são alguns dos defeitos indicadores da existência de podridões internas, e que podem ser utilizados na análise de risco de rutura associado a estas árvores (Mattheck & Breloer, 1994).

### **1.3.1. Identificação com base nas características das frutificações e estruturas vegetativas**

Convencionalmente a identificação de fungos lenhícolas depende em grande parte da observação das frutificações. Estas, por norma, formam-se no exterior da árvore, em locais onde é evidente a presença de grandes acumulações de micélio. O seu crescimento apresenta tanto um geotropismo negativo como um fototropismo negativo (Passola, 2011). Os basidiomas podem exibir as mais diversas formas - prateleira, casco, chapéu, etc. – e texturas – semelhante à da cortiça, cabedal, madeira, carnudos, etc. – e aglomerações podem ocorrer tanto na base do tronco como junto a lesões (Lonsdale, 1999). Podem ser perenes ou anuais, sendo que o primeiro tipo possibilita o estudo da evolução da podridão em função das suas características. Estes carpóforos formam a camada himenial fértil do segundo ano abaixo do himénio do ano precedente, sendo assim possível avaliar os distintos anos de crescimento. Já os basidiocarpos anuais indicam com frequência as fases de colonização ou de expansão importantes na madeira.

Em termos de identificação no campo, a estrutura, o tamanho, a textura e a cor dos basidiomas (ou dos ascocarpos) são caracteres importantes, que podem apresentar grande variabilidade quer inter quer intraespecífica (Grangeia, 2012). Espécies próximas podem contudo apresentar carpóforos muito semelhantes sendo necessário recorrer à observação de outros parâmetros (Lonsdale, 1999). Quando dado carpóforo não pode ser identificado no campo, a estrutura ou uma parte da estrutura deverá ser colhida para posterior observação de caracteres microscópicos. Por norma recorre-se à consulta de chaves dicotómicas disponíveis para vários grupos de fungos lenhícolas, e que são sustentadas na macromorfologia dos basidiomas bem como na micromorfologia do sistema hifal, órgãos himenais e basidiósporos. A determinação da espécie através do uso das chaves requer um largo conhecimento micológico. Chaves mais simplificadas para fungos lenhícolas que atacam árvores em zonas urbanas são normalmente adequadas para discriminar até ao nível do género. Contudo, se o diagnóstico da podridão tiver como objetivo a gestão da árvore, sobretudo no que respeita à gestão do risco de rutura, a identificação ao nível da espécie poderá ser indispensável já que a agressividade de cada fungo e a capacidade para

ultrapassar as defesas do hospedeiro podem ser muito variáveis entre espécies do mesmo género (Schwarze et al., 2000).

### **1.3.2. Identificação com base nas características culturais**

A análise de culturas puras de fungos isolados a partir de micélio ou de madeira apodrecida pode ser usada quando não existem carpóforos disponíveis. Chaves baseadas na taxa de crescimento, nas características microscópicas e em características enzimáticas do micélio têm sido publicadas para a identificação de vários basidiomicetas ao nível da espécie (Schwarze et al., 2000). Além disso testes de compatibilidade sexual, executados com base no confronto e emparelhamento dos isolados a identificar com isolados-teste haplóides, podem também ser ferramentas eficazes de diagnóstico (Nicolotti et al., 2010). Esses testes de compatibilidade sexual resultam na produção de micélio heterocariótico estável geneticamente, detetável por alteração do aspeto das colónias bem como pela formação de ansas de anastomose ou grampos de conexão nas hifas adjacentes dos isolados confrontados. Quando ocorre a formação de ansas de anastomose passa-se de uma colónia com uma rede de hifas radial para uma colónia com uma rede tridimensional, podendo ser este o principal fator que permite a produção de frutificações (Carlile et al., 2001).

De referir que a identificação de fungos lenhícolas, especialmente de basidiomicetas, a partir de culturas puras pode tornar-se um processo dispendioso e com resultados aquém do esperado (Schwarze et al., 2000). A amostragem da madeira apodrecida deve ser representativa e de preferência feita a partir de uma zona de transição que compreenda tecido são, tecido com descoloração e tecido já degradado. Em árvores em pé esta amostragem poderá implicar a obtenção de uma ou mais verrumadas (amostra obtida com verruma de Pressler), o que em espaços urbanos se pode tornar complicado pelas implicações estéticas que podem advir. Acresce ainda que frequentemente, quer sobre o material amostrado quer nas colónias em desenvolvimento em meios de cultura, ocorre o desenvolvimento de outros fungos contaminantes, sendo necessário recorrer a meios seletivos que encarecem o processo (Nicolotti et al., 2010).

### **1.3.3. Identificação com base em técnicas bioquímicas**

Diversas técnicas bioquímicas têm vindo a ser desenvolvidas para deteção e identificação de fungos causadores de podridão castanha em madeiras em utilização (Jellison & Jasalavich, 2000; Clausen & Kartal, 2003).

Entre as técnicas bioquímicas utilizadas destacam-se a análise qualitativa de proteínas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e a análise dos perfis de isoenzimas dos fungos agentes causais de podridões. A técnica SDS-PAGE tem sido utilizada para a identificação de fungos agentes causais de podridões em madeiras a níveis taxonómicos específicos e infraespecíficos (Schmidt & Moreth, 1985). Já a caracterização dos perfis de isoenzimas dos fungos permite diferenciar espécies estreitamente aparentadas e tem sido uma técnica bastante usada para estudos de variabilidade inter e intraespecífica de espécies pertencentes a *Armillaria* sp. e *Heterobasidion annosum* (Wahlstrom et al., 1991; Otrosina et al., 1992). Estas duas abordagens apresentam no entanto inconvenientes, nomeadamente por ser necessário o isolamento em cultura pura do fungo para além de grande quantidade de micélio. Apresentam ainda a desvantagem de serem pouco sensíveis na deteção de estados iniciais de degradação da madeira (Nicolotti et al., 2009).

No que diz respeito a técnicas imunológicas, a técnica ELISA (“enzyme-linked immunorbent assay”) foi empregue, por exemplo, por Priestley et al. (1994) para deteção rápida de *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. e de *A. ostoyae* (Romagn.) Herink a partir de amostras de madeira e por Utomo & Niepold (2000) para detetar espécies patogénicas de fungos de género *Ganoderma* em palmeira-de-óleo. Embora esta técnica permita fazer a análise a um grande número de amostras, há o risco de reações positivas com organismos que nada têm a ver com a podridão da madeira (Schmidt, 2007) para além de a sensibilidade do método ser afetada por alguns compostos presentes na madeira (Jellison & Goodell, 1989).

#### 1.3.4. Identificação com base em técnicas moleculares

Técnicas moleculares, particularmente a tecnologia da PCR (“polymerase chain reaction”), têm revolucionado o diagnóstico etiológico dos fungos e possibilitado estudos de variabilidade genética das populações de fungos lenhícolas.

À semelhança da técnica ELISA, também as técnicas que se baseiam na PCR permitem a identificação dos agentes causais das podridões do lenho a partir de amostras de madeira, sem que seja indispensável cultivar os fungos em causa. No entanto, a extração do DNA destes fungos a partir da madeira apresenta algumas dificuldades pois para além das moléculas de DNA poderem estar parcialmente degradadas (Jasalavich et al., 2000), a presença de determinados compostos na madeira (como polifenóis, taninos, etc.) pode inibir a reação PCR (Bahweg et al., 1998).

Recentemente, Guglielmo (2005) desenvolveu um protocolo de extração de DNA de fungos lenhícolas a partir da madeira apodrecida ou em fases iniciais de degradação. Com

base neste protocolo, Guglielmo et al. (2007, 2008) validaram diversas técnicas moleculares para diagnóstico de podridões causadas por fungos dos gêneros *Ganoderma*, *Inonotus s.l.* e *Phellinus s.l.*, utilizando amostras de madeira.

As técnicas moleculares utilizadas para a identificação de fungos dividem-se em dois grandes grupos: (i) diversidade caracterizada por meio de marcadores desconhecidos, dirigidos aleatoriamente à generalidade do genoma e (ii) diversidade caracterizada através de regiões específicas do genoma.

No primeiro grupo encontram-se por exemplo as técnicas RAPD, RFLP e ISSR. A técnica RAPD-PCR foi empregue por Göller & Rudolph (2003) para distinguir estirpes de *Coniophora puteana* (Shumach) P. Karst. Contudo, segundo Nicolotti et al. (2010), esta não deve ser utilizada com DNA extraído a partir de amostras ambientais, nomeadamente madeira. Já Gonthier et al. (2001) recorreram ao estudo dos perfis RFLP para diferenciarem espécies de *Heterobasidion* spp.

O segundo grupo de técnicas moleculares implica o conhecimento da sequência nucleotídica de regiões com interesse para estudos de taxonomia e diversidade e a utilização de iniciadores desenhados especificamente para identificar determinados grupos taxonómicos. Assim, por exemplo, iniciadores específicos desenhados e sintetizados a partir da região ITS do rDNA, permitiram a deteção e identificação de isolados de *Armillaria mellea* (Sicoli et al., 2003), de *Ganoderma* spp. (Guglielmo et al., 2007; Nicolotti et al., 2009), de *Heterobasidion* spp. (Garbelotto et al., 1996), de *Inonotus* spp. (Guglielmo et al., 2008) e de *Phellinus weirii* s.s. (Murrill) Gilb. (Lim et al., 2005), entre outros. Há também referência à utilização de iniciadores específicos para a região LSU do rDNA para diferenciação de espécies de *Fomitiporia pseudopunctata* (A. Davied et al.) Fiasson (Decock et al., 2005), de *Daldinia* spp. (Miller et al., 2007; Stadler et al., 2014), de *Ganoderma* spp. (Guglielmo et al., 2007; Song et al., 2015) e de *Inonotus* spp. (Guglielmo et al., 2007; Wagner & Fischer, 2002).

Como referido antes, o conhecimento prévio da sequência de nucleótidos da região de DNA alvo é primordial para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico eficientes, tais como a utilização de iniciadores específicos para os vários taxa e marcadores RFLP. Além disso, a própria sequência de DNA também pode ser utilizada como um meio simples e eficiente de identificação, explorando potenciais polimorfismos não apenas em um local restrito, mas em toda a região considerada. Neste caso o produto de amplificação por PCR obtido a partir da amostra desconhecida é submetido a uma reação de sequenciação que originará a sequência de nucleótidos completa para o fragmento em causa. A sequência desconhecida é então comparada, por meio da ferramenta BLAST (“basic local alignment search tool”), com outras sequências depositadas em bases de dados.

#### 1.4. Objetivos do trabalho

A arboricultura urbana tem as suas origens na América do Norte e na Europa (Konijnendijk et al. 2000). É uma ciência que agrega o conhecimento comum a diversas áreas, desde arboricultura, biologia, silvicultura, horticultura, arquitetura paisagista, ciências sociais e ecologia, e em relação à qual é evidente um interesse crescente (Cox, 2011). A existência de árvores em espaços verdes urbanos ocorre quer associada a florestas peri-urbanas quer a árvores isoladas. Em espaço urbano, normalmente classificam-se as árvores em três categorias, segundo as condições em que são instaladas e vegetam: árvores crescendo em matas urbanas (“trees growing in urban woodlands”), árvores em parques ou jardins (“park trees”) e árvores de arruamento, também chamadas de árvores de alinhamento ou de caldeira (“street trees”) (Cox, 2011). O presente trabalho teve como objeto de estudo as árvores em parques ou jardins e as árvores de arruamento.

As árvores desempenham um papel fulcral na construção dos aglomerados urbanos, contribuindo para a qualidade de vida dos cidadãos a vários níveis (Kuchelmeister, 2000). Porém, as árvores são organismos que podem atingir dimensões apreciáveis, sendo frequente tornarem-se uma fonte de conflitos, especialmente em zonas residenciais com grande pressão de utilização. Nas cidades modernas o espaço disponível para o elemento verde é limitado, pelo que as árvores estão sujeitas a inúmeros fatores de stresse, sejam danos ao nível das raízes e do tronco devido ao trânsito automóvel, como a trabalhos de construção, podas severas e compactação elevada do solo, para citar apenas alguns. Muitas destas intervenções dão origem a lesões que expõem o interior das árvores à ação de uma panóplia de organismos, nomeadamente fungos que, ao colonizar os tecidos da árvore produzem enzimas que degradam as paredes celulares dos tecidos lenhosos. Esta degradação leva ao aparecimento de podridões, por vezes com formação de cavidades, que afetam a estabilidade mecânica das árvores e podem mesmo fazer com que estas quebrem ou caiam. A capacidade de detetar precocemente estas situações é pois fundamental em termos de gestão de árvores em espaços urbanos.

Com o presente trabalho pretendeu-se obter e analisar dados que permitissem contribuir para o conhecimento da identidade e variabilidade dos fungos agentes causais de podridões do lenho em algumas espécies de árvores utilizadas em espaços verdes na região de Lisboa. Para tal procedeu-se à caracterização cultural e morfológica dos isolados obtidos. Os estudos moleculares realizados visaram a obtenção das sequências nucleotídicas das regiões ITS e LSU (28S) do rDNA, e permitiram não só confirmar a identidade dos isolados como também estudar a variabilidade genética dos mesmos.



reação quando friccionado, forma dos poros, cor e consistência da superfície estéril, incluindo a presença de apêndices, cor e odor do contexto (parte central) do himénio, presença de linhas ou camadas com diferentes colorações no contexto do himénio e cor da esporada (acumulação de esporos libertados pela estrutura quando colocada sobre uma folha branca).

### **2.3. Obtenção de isolados**

Após a recolha das amostras foi necessário proceder ao isolamento dos fungos, sendo que o método utilizado variou de acordo com o tipo de substrato.

*Procedimento a partir de lenho apodrecido (secções transversais de troncos ou ramos e ramos):*

No laboratório cortaram-se as amostras de tecido infetado em pequenas secções, com dimensões médias de 2-3 cm de comprimento, na zona de transição entre o lenho atacado e o lenho são, por ser o local onde o fungo se encontra mais ativo. Posteriormente, e já em câmara de fluxo laminar, as porções de tecido infetado foram desinfetadas superficialmente por imersão numa solução aquosa de NaClO a 1 %, seguida de uma passagem por água destilada esterilizada e deposição sobre folha de papel de filtro esterilizada, para retirar o excesso de líquido. Cada amostra foi seccionada em cinco porções que se dispuseram na superfície de placa de Petri, contendo 15 mL de meio de gelose de batata dextrosada (PDA, 30 g/L de Potato Dextrose Agar, Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) suplementado, após autoclavagem e arrefecimento a 45 °C, com 250 mg/L de sulfato de estreptomicina.

As placas foram colocadas em estufa de incubação, à temperatura de 25 °C±1 °C na ausência de luz, por um período de cinco a sete dias. Contabilizaram-se as colónias obtidas e repicaram-se para placas de Petri contendo PDA os fungos que, ou pela frequência com que foram obtidos ou pelas características culturais e morfológicas que apresentavam, eram compatíveis com as descrições de colónias de fungos basidiomicetas lenhícolas. As repicagens visaram a obtenção de culturas de hifa única para posterior identificação sistemática. As placas originais foram mantidas à temperatura ambiente e sob luz difusa por um período de 30 dias, tendo sido observadas semanalmente.

*Procedimento a partir de frutificações:*

Sempre que possível procedeu-se à colheita de frutificações com aparência recente e que de preferência não estivessem em contacto com o solo, para evitar contaminações. As frutificações foram acondicionadas em tubos Falcon (50 mL) ou em sacos de plástico limpos, e transportadas o mais rapidamente possível para o laboratório, onde se procedeu

ao seu seccionamento com vista quer à identificação morfológica (cap. 2.7) quer para isolamento e obtenção de culturas puras. O isolamento e cultura em meio de PDA foram executados tal como anteriormente descrito, partindo de pequenas porções de tecido micelial retiradas da parte central do himénio dos basidiomas.

A identificação dos isolados obtidos, quer a partir de basidiomas quer a partir de lenho apodrecido, teve por base a observação das características culturais e microscópicas das culturas puras de acordo com Nobles (1948) e Stalpers (1978).

#### **2.4. Conservação e constituição da coleção de isolados**

Os isolados obtidos foram mantidos em tubos de micoteca contendo PDA inclinado, em condições de refrigeração. Todos os isolados receberam um número de código e foram depositados na base de dados da micoteca do LPVVA.

No total foram recolhidas 57 amostras, das quais resultou a obtenção de 76 isolados, cujo passaporte se encontra discriminado no Quadro 1.

Na coleção de fungos a estudar foram ainda incluídos sete isolados provenientes da micoteca do LPVVA (isolados B012A, B024A a B026A e B051A a B053A).

Para efeitos de comparação utilizaram-se quatro isolados pertencentes à micoteca do INIAV, previamente identificados como *Ganoderma resinaceum* (isolados GR475, GR571, GR572 e GR573).

**Quadro 1.** Dados de passaporte dos isolados de fungos incluídos no presente estudo, com menção dos isolados mantidos em cultura pura e dos isolados para os quais se obtiveram as sequências nucleotídicas para as regiões ITS e LSU do rDNA

Código isolado	Género/Espécie <sup>(a)</sup>	Hospedeiro	Local de colheita	Data de colheita	Substrato	Cultura pura	Sequências	
							ITS	LSU
B001A	<i>Inonotus rickii</i>	<i>Celtis australis</i>	R. Artilharia 1, Lisboa	jan-15	basidiocarpo	X	X	X
B001B	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Artilharia 1, Lisboa	jan-15	basidiocarpo	X		
B001C	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Artilharia 1, Lisboa	jan-15	basidiocarpo	X	X	
B001D	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Artilharia 1, Lisboa	jan-15	basidiocarpo	X		
B002A	n.i.	<i>Schinus terebinthifolius</i>	Palácio de Queluz, Queluz	jan-15	ramo com podridão branca	X		
B003A	<i>Phellinus punctatus</i>	<i>Buxus sempervirens</i>	Palácio de Queluz, Queluz	jan-15	basidiocarpo	X		
B003B	<i>P. punctatus</i>	<i>B. sempervirens</i>	Palácio de Queluz, Queluz	jan-15	basidiocarpo	X	X	X
B003C	<i>P. punctatus</i>	<i>B. sempervirens</i>	Palácio de Queluz, Queluz	jan-15	basidiocarpo	X	X	
B003D	<i>P. punctatus</i>	<i>B. sempervirens</i>	Palácio de Queluz, Queluz	jan-15	basidiocarpo	X	X	
B004A	<i>Ganoderma australe</i>	<i>C. australis</i>	R. Jau, Lisboa	jan-15	basidiocarpo	X	X	
B004B	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Jau, Lisboa	jan-15	basidiocarpo	X		
B005A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Jau, Lisboa	jan-15	anamorfo	X	X	X
B006A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Luís de Camões, Lisboa	jan-15	anamorfo	X	X	
B006B	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Luís de Camões, Lisboa	jan-15	anamorfo	X	X	
B007A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Luís de Camões, Lisboa	jan-15	anamorfo	X	X	
B008A	<i>Daldinia concentrica</i>	<i>C. australis</i>	R. Luís de Camões, Lisboa	jan-15	frutificação	X	X	X
B009A	<i>Fistulina hepatica</i>	<i>Quercus suber</i>	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo	X	X	
B010A	<i>Phellinus torulosus</i>	<i>Cupressus lusitanica</i>	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo			
B010B	<i>P. torulosus</i>	<i>C. lusitanica</i>	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo	X		
B011A	<i>Inonotus hispidus</i>	<i>Platanus</i> sp.	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo	X		
B011B	<i>I. hispidus</i>	<i>Platanus</i> sp.	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo			
B012A*	<i>Pleurotus</i> sp.	<i>C. lusitanica</i>	Qta. Conchas e do Lumiar, Lisboa	set-02	secção do tronco	X	X	
B013A	n.i.	<i>C. australis</i>	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo	X	X	

Quadro 1. (continuação da página anterior)

Código isolado	Género/Espécie <sup>(a)</sup>	Hospedeiro	Local de colheita	Data de colheita	Substrato	Cultura pura	Sequências	
							ITS	LSU
B014A	<i>Trametes</i> sp.	<i>Fraxinus</i> sp.	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo	X	X	X
B015A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo			
B016A	<i>G. australe</i>	<i>Schinus molle</i>	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo	X	X	X
B017A	<i>Lenzites</i> sp.	<i>Fraxinus</i> sp.	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo	X	X	
B018A	<i>P. torulosus</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo	X		
B019A	<i>P. punctatus</i>	<i>Pittosporum</i> sp.	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo	X	X	X
B020A	<i>P. torulosus</i>	<i>Fraxinus</i> sp.	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo	X		
B021A	n.i.	<i>Phillyrea latifolia</i>	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo	X	X	
B021B	n.i.	<i>P. latifolia</i>	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo	X	X	
B021C	n.i.	<i>P. latifolia</i>	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo			
B022A	<i>P. punctatus</i>	<i>Cercis siliquastrum</i>	Tapada da Ajuda, Lisboa	fev-15	basidiocarpo	X		
B023A	<i>P. torulosus</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Palácio Vala Real, Azambuja	fev-15	basidiocarpo	X	X	
B024A*	<i>Agrocybe</i> sp.	<i>Populus</i> sp.	Praça Afrânio Peixoto, Lisboa	out-02	basidiocarpo	X		
B025A*	<i>Armillaria</i> sp.	<i>Pinus pinea</i>	Portel, Portel	jun-07	raminhos	X		
B026A*	<i>Armillaria</i> sp.	<i>Photinia</i> sp.	Birre, Cascais	dez-12	colo e raízes	X		
B027A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Artilharia 1, Lisboa	fev-15	anamorfo	X		
B027B	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Artilharia 1, Lisboa	fev-15	anamorfo	X	X	
B028A	<i>Phellinus pomaceus</i>	<i>Prunus</i> sp.	Oeiras, Oeiras	fev-15	basidiocarpo	X		
B029A	<i>Schizophyllum commune</i>	<i>C. australis</i>	R. Jau, Lisboa	fev-15	basidiocarpo			
B029B	<i>S. commune</i>	<i>C. australis</i>	R. Jau, Lisboa	fev-15	basidiocarpo			
B030A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Pedro Calmon, Lisboa	fev-15	anamorfo			
B031A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	Alameda dos Pinheiros, Lisboa	mar-15	anamorfo	X	X	X
B032A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	Alameda dos Pinheiros, Lisboa	mar-15	anamorfo			

Quadro 1. (continuação da página anterior)

Código isolado	Género/Espécie <sup>(a)</sup>	Hospedeiro	Local de colheita	Data de colheita	Substrato	Cultura pura	Sequências	
							ITS	LSU
B032B	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	Alameda dos Pinheiros, Lisboa	mar-15	anamorfo	X		
B033A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	Alameda dos Pinheiros, Lisboa	mar-15	basidiocarpo	X		
B034A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	Alameda dos Pinheiros, Lisboa	mar-15	anamorfo	X	X	
B035A	<i>Ganoderma resinaceum</i>	<i>Platanus</i> sp.	Alameda dos Pinheiros, Lisboa	mar-15	basidiocarpo	X	X	X
B036A	<i>D. concentrica</i>	<i>Fraxinus</i> sp.	Alameda dos Pinheiros, Lisboa	mar-15	frutificação	X	X	X
B037A	<i>P. punctatus</i>	<i>Platanus</i> sp.	Alameda dos Pinheiros, Lisboa	mar-15	basidiocarpo	X		
B037B	<i>P. punctatus</i>	<i>Platanus</i> sp.	Alameda dos Pinheiros, Lisboa	mar-15	basidiocarpo			
B037C	<i>P. punctatus</i>	<i>Platanus</i> sp.	Alameda dos Pinheiros, Lisboa	mar-15	basidiocarpo	X		
B038A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Pedro Calmon, Lisboa	mar-15	anamorfo	X	X	
B038B	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Pedro Calmon, Lisboa	mar-15	anamorfo	X	X	
B039A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Pedro Calmon, Lisboa	mar-15	anamorfo	X	X	
B040A	<i>P. pomaceus</i>	<i>Styphnolobium japonicum</i>	R. João de Barros, Lisboa	mar-15	basidiocarpo	X		
B041A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Jau, Lisboa	mar-15	anamorfo			
B042A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Jau, Lisboa	fev-15	basidiocarpo			
B043A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Jau, Lisboa	fev-15	anamorfo			
B044A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Jau, Lisboa	fev-15	anamorfo			
B045A	n.i.	<i>C. australis</i>	R. Jau, Lisboa	fev-15	ramo com podridão branca			
B046A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Jau, Lisboa	fev-15	anamorfo			
B047A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Jau, Lisboa	fev-15	anamorfo	X	X	X
B048A	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. Artilharia 1, Lisboa	fev-15	basidiocarpo			
B049A	n.i.	<i>C. australis</i>	R. Artilharia 1, Lisboa	mar-15	ramo com podridão branca			
B050A	<i>P. torulosus</i>	<i>Acacia</i> sp.	Museu da Cidade, Lisboa	mar-15	basidiocarpo	X	X	
B051A*	<i>P. pomaceus</i>	<i>Prunus</i> sp.	Palácio do Machadinho	jan-13	basidiocarpo	X		

**Quadro 1.** (continuação da página anterior)

Código isolado	Género/Espécie <sup>(a)</sup>	Hospedeiro	Local de colheita	Data de colheita	Substrato	Cultura pura	Sequências	
							ITS	LSU
<b>B052A*</b>	<i>S. commune</i>	<i>Tilia</i> sp.	Seixal, Seixal	jul-05	basidiocarpo	X		
<b>B053A*</b>	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Tilia</i> sp.	R. Dom João de Castro, Sintra	jul-05	basidiocarpo	X	X	X
<b>B054A</b>	<i>D. concentrica</i>	<i>Citrus</i> sp.	Rua São Gregório, Sintra	abr-15	frutificação	X	X	X
<b>B054B</b>	<i>D. concentrica</i>	<i>Citrus</i> sp.	Rua São Gregório, Sintra	abr-15	frutificação	X		
<b>B055A</b>	<i>G. australe</i>	<i>C. australis</i>	Fábrica da Pólvora, Oeiras	abr-15	basidiocarpo	X	X	
<b>B056A</b>	<i>P. pomaceus</i>	<i>Prunus</i> sp.	Fábrica da Pólvora, Oeiras	abr-15	basidiocarpo			
<b>B057A</b>	<i>G. australe</i>	<i>Apollonias barbujana</i>	J. Botânico de Lisboa, Lisboa	mai-15	basidiocarpo	X		
<b>B058A</b>	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Ceratonia siliqua</i>	Paço de Arcos, Oeiras	jul-15	basidiocarpo			
<b>B059A</b>	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	R. do Embaixador, Lisboa	jul-15	anamorfo	X	X	X
<b>B060A</b>	<i>G. resinaceum</i>	<i>Ulmus</i> sp.	Jardins da Gulbenkian, Lisboa	jul-15	basidiocarpo	X	X	X
<b>B061A</b>	<i>G. australe</i>	<i>Platanus</i> sp.	Queijas, Oeiras	jul-15	basidiocarpo	X	X	X
<b>B062A</b>	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Acer</i> sp.	Algés, Oeiras	ago-15	basidiocarpo			
<b>B063A</b>	<i>I. rickii</i>	<i>C. australis</i>	Jardim da Estrela, Lisboa	dez-15	basidiocarpo			
<b>B064A</b>	<i>Laetiporus sulphureus</i>	<i>Eucaliptus</i> sp.	Tapada da Ajuda, Lisboa	dez-15	basidiocarpo			
<b>GR475**</b>	<i>G. resinaceum</i>	<i>Q. suber</i>	S. Marcos da Serra, Silves	out-66	basidiocarpo	X	X	X
<b>GR571**</b>	<i>G. resinaceum</i>	<i>Acacia melanoxylon</i>	Mata Nacional da Machada, Almada	out-73	basidiocarpo	X	X	X
<b>GR572**</b>	<i>G. resinaceum</i>	<i>A. melanoxylon</i>	Mata Nacional da Machada, Almada	out-74	basidiocarpo	X	X	X
<b>GR573**</b>	<i>G. resinaceum</i>	<i>Q. suber</i>	Castelo Branco	dez-06	basidiocarpo	X	X	X

<sup>(a)</sup> Identificação com base em Breitenbach & Kränzlin (1986) e Gonthier & Nicolotti (2007); n.i. não identificado; \* isolados provenientes da micoteca do LPVVA; \*\* isolados-referência provenientes da micoteca do INIAV.

## **2.5. Influência do meio de cultura no crescimento micelial**

Para estudar o efeito do meio de cultura no crescimento micelial selecionaram-se sete isolados de *Inonotus rickii* (B001A, B004B, B005A, B007A, B027B, B032B e B044A) e quatro isolados do género *Ganoderma* (B016A, B035A, B053A e B057A). A seleção foi feita tendo em conta a origem dos isolados, os hospedeiros e o aspeto morfológico das colónias.

O crescimento micelial foi avaliado à temperatura de 25 °C na obscuridade, em placas com 90 mm de diâmetro e em dois meios de cultura: PDA, com a mesma dosagem referida anteriormente, e MEA a 2 % (w/v) (2 % de malte – Malt Oxoid e 0,2 % de agar - Bacto™ Agar). O ensaio teve a duração de 10 dias, com medições ao 4º, 7º, 9º e 10º dia, do diâmetro das colónias segundo dois eixos ortogonais. Partiu-se de discos de micélio de 4 mm de diâmetro que foram assepticamente cortados, com o auxílio de um anel cortante, da frente de crescimento das colónias com cinco dias de idade, e transferidos para o centro das placas de PDA e MEA. Efetuaram-se três repetições por isolado por meio de cultura ensaiado. Os critérios de seleção, quer dos meios de cultura, quer da temperatura e do período de incubação, a usar nestes estudos, foram baseados nos resultados de Simone et al. (2011).

Os dados registados foram objeto de análise estatística, recorrendo-se ao programa Statistica 6.0 (StatSoft Inc.), realizando-se uma ANOVA a um fator para a taxa de crescimento (isolado) e uma ANOVA a dois fatores (isolado; efeitos fixos) para conhecer a interação entre os isolados e o meio de cultura, ambas seguidas de teste de comparação de médias (teste Tukey, a 95 % de confiança).

## **2.6. Caraterização cultural**

As colónias obtidas no ensaio acima descrito foram ainda usadas para a respetiva descrição cultural, ao fim de 10 dias de crescimento. Considerou-se o seguinte conjunto de características: textura, densidade, coloração, natureza da frente de crescimento, aspeto à transparência, zonagem, presença de frutificações e aspeto da face inferior. A coloração das colónias foi registada de acordo com o código de cores de Saccardo (1891) e todas as outras características foram revistas segundo Stalpers (1978).

## **2.7. Caraterização morfológica**

Para a caraterização morfológica dos 11 isolados acima estudados consideraram-se o aspeto das hifas (forma e septação), a presença de clamidósporos e a ocorrência de

cristais. Para observação das características em questão, realizaram-se preparações entre lâmina e lamela com ácido láctico ou com lactofenol de azul de algodão, a partir de micélio retirado da superfície de colónias em PDA e em MEA com 10 dias de idade. As preparações foram observadas ao microscópio (Leica DM 2500) com uma ampliação de 400 x, e fotografadas por forma a obter vários campos óticos e encontrar estruturas características dos fungos em questão.

## **2.8. Extração e Quantificação do DNA**

Para obtenção de micélio dos fungos, inocularam-se placas de Petri contendo aproximadamente 15 mL de PDA, à superfície do qual se havia depositado uma folha de celofane previamente esterilizada, com um disco de micélio retirado da periferia de culturas com 8 a 10 dias de idade. As placas foram incubadas à temperatura ambiente e luz difusa, por período variável consoante o número de dias necessário para se observar o crescimento das colónias sem que estas atingissem o rebordo das placas.

O micélio foi raspado da superfície da folha de celofane e colocado em tubos de Eppendorf (1,5 mL), que foram acondicionadas por algumas horas a -20 °C e posteriormente liofilizadas (Liofilizador EDWARDS Micromodulyo, Edwards High Vacuum International, UK). Para cada isolado pesaram-se cerca de 20 mg de micélio liofilizado que foi macerado com a ajuda de um almofariz, pilão e areia acidificada (Sand sulphuric acid washed - VWR International bvba/sprl), de modo a que ficasse preparado para a execução do Protocolo de extração “DNeasy Plant Mini kit” (QIAGEN, Hilden, Alemanha) (Anexo 1).

A quantificação do DNA extraído foi realizada por espectrofotometria em NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, UK) ou por comparação de bandas observadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % (p/v) com bandas produzidas por uma série de quantidades conhecidas de marcador  $\lambda$ -DNA (Lambda Deoxyribonucleic Acid, Amersham Pharmacia Biotech). Preparou-se um gel de agarose (UltraPure Agarose, Gibco, Paisley, UK) a 0,8 % (p/v) em solução tampão TBE 0,5 x (45 mM de Tris-base; 45 mM de ácido bórico; 1 mM de EDTA, pH 8,0) de acordo com o protocolo de Sambrook et al. (1989), ao qual se juntou GreenSafe Premium (Nzytech, Lda., PT), em alternativa ao uso do brometo de etídio. O gel foi colocado numa tina de eletroforese horizontal (Horizon 20.25, Gibco). A eletroforese decorreu a uma voltagem de 120 V durante um período que variou entre 90 e 120 minutos. A visualização das bandas foi efetuada em transiluminador UV (BTX 20.M) de comprimento de onda de 321 nm, imprimindo-se a fotografia com os resultados obtidos numa impressora térmica (Mitsubishi, modelo P91). Por comparação das bandas obtidas com o marcador molecular, determinou-se a concentração de DNA dos isolados em estudo.

## 2.9. Análise da região ITS do DNA ribossomal

De modo a comparar as sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA entre isolados, procedeu-se à amplificação da região ITS de um conjunto de isolados selecionados (Quadro 1) usando os iniciadores universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). As reações de amplificação foram executadas numa mistura de reação (25 µL) contendo 25 ng de DNA, 12,5 µL de ReadyMix Red Taq (Sigma, St. Louis, EUA) e 1,25 µL de cada iniciador (STAB VIDA - Inv. e Serv. Ciências Biológicas, Lda), nas condições descritas por Ramos (2009) e Nilsson et al. (2009). A amplificação decorreu num termociclador programado para: 1 ciclo de 2 min. a 95 °C, 30 ciclos de 1 min. a 94 °C, 1 min. a 58 °C e 1 min. a 72 °C, terminando com um ciclo de 5 min. a 72 °C.

O fragmento amplificado (cerca de 540 pb) foi purificado usando "QIAquick PCR Purification Kit" (QIAGEN, Hilden, Alemanha) (Anexo 2). O DNA obtido foi eluído em 30-50 µl de Tris 1 mM pH 8,5 e quantificado por espectrofotometria. Os fragmentos amplificados e quantificados, juntamente com o iniciador ITS1, foram enviados para sequenciação na empresa STAB VIDA - Inv. e Serv. Ciências Biológicas, Lda.

As sequências obtidas para cada isolado foram compiladas num único ficheiro e alinhadas usando os programas FinchTV e BioEdit. Foram produzidos dendrogramas recorrendo ao programa MEGA 5. Geraram-se 2000 conjuntos de dados por "bootstrapping" sendo estes analisados por análise de agrupamento (algoritmo Neighbor-Joining; Hall, 2013) realizada sob matrizes de distância calculadas segundo o modelo evolutivo Kimura-2P. Compararam-se as sequências obtidas com sequências nucleotídicas disponíveis na base de dados do NCBI ("national center for biotechnology information") (Quadro 2) e produziram-se dendrogramas de consenso que se editaram com o programa MEGA 5 e matrizes de correlação.

## 2.10. Análise da região LSU do DNA ribossomal

De modo a comparar as sequências nucleotídicas da região LSU do rDNA entre isolados, procedeu-se à amplificação da região LSU dos isolados selecionados (Quadro 1) usando os iniciadores NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') e NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') (Sonnenberg et al., 2007). Todo o processo de amplificação, com a diferença dos iniciadores a utilizar na mistura, foi baseado na mesma

metodologia acima descrita para a região ITS. O mesmo aconteceu para a purificação e o envio para sequenciação dos isolados.

As sequências obtidas passaram igualmente pelo processo de edição, alinhamento e comparação com as sequências nucleotídicas disponíveis na base de dados do NCBI (Quadro 2), com recurso aos programas nomeados anteriormente.

**Quadro 2.** Número de acesso, origem e referências de todas as sequências retiradas do NCBI (isolados de comparação e outgroups) usadas na construção das árvores filogenéticas, para a região ITS e LSU

Espécie	Nome isolado	Nº acesso GenBank		Hospedeiro	Origem	Referência
		ITS	LSU			
<i>Daldinia childiae</i> J.D. Rogers & Y.M. Ju	2-00219-2	KT192354		<i>Platycladus orientalis</i> (L.) Franco	China	Bu & Yu (2015)
<i>Daldinia childiae</i>	HP025		KT323236	<i>Pinus sylvestris</i> L.	Espanha	Martinez-Alvarez et al. (2016)
<i>Daldinia childiae</i>	ILLS 58258		EF562505	n.a.	EUA	Miller et al. (2007)
<i>Daldinia concentrica</i> (Bolton) Ces. & De Not.	Aa. Pedersen (C)	AF176954		<i>Fraxinus</i> sp.	Dinamarca	Johannesson et. al (2000)
<i>Daldinia concentrica</i>	Coppins 3321 (E)	AF176955		<i>Fraxinus</i> sp.	Inglaterra	Johannesson et. al (2000)
<i>Daldinia concentrica</i>	23850	AF176957		<i>Fraxinus</i> sp.	Dinamarca	Johannesson et. al (2000)
<i>Daldinia concentrica</i>	CBS 113277		KT281895	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	Alemanha	Stadler et al. (2014)
<i>Fomitiporia mediterranea</i> M. Fisch.	MUCL 46730	EF442330		n.a.	França	Decock et al. (2007)
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	LM2	AY340022		<i>Vitis vinifera</i> (DC.) Beg.	Itália	Fischer & Binder (2004)
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	MUCL 38514	GU461953		n.a.	Itália	Decok et al. (2007)
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	45/23	AF515585		<i>Vitis vinifera</i>	Alemanha	Fischer (2002)
<i>Fomitiporia pseudopunctata</i> (A. Davied et al.) Fiasson	MUCL 44799		AY618203	n.a.	Itália	Decock et al. (2005)
<i>Fomitiporia pseudopunctata</i>	MUCL 44806		AY618202	n.a.	Itália	Decock et al. (2005)
<i>Fomitiporia pseudopunctata</i>	MUCL 51325		GU461981	n.a.	República Checa	Amalfi et al. (2010)
<i>Ganoderma adspersum</i> (Schulzer) Donk	DP87	AM269826		<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Itália	Guglielmo et al. (2007)
<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.	ATCC 44053		AY515339	n.a.	n.a.	Kim et al. (2005)
<i>Ganoderma applanatum</i>	Dai 8924		KU220014	n.a.	China	Song et al. (2015)
<i>Ganoderma applanatum</i>	olrim925 (SUAS)	AY787672		<i>Fraxinus excelsior</i>	Lituânia	n.a.
<i>Ganoderma applanatum</i>	K(M)120830	AY884178		n.a.	Inglaterra	n.a.
<i>Ganoderma australe</i> (Fr.) Pat.	Moncalvo 0705	AF026672		n.a.	n.a.	Hibbett et al. (1997)
<i>Ganoderma lingzhi</i> S.H. Wu, Y. Cao & Y.C. Dai	Dai 15799	KU219991	KU220019	n.a.	China	Song et al. (2015)

**Quadro 2.** (continuação da página anterior)

Espécie	Nome isolado	Nº acesso GenBank		Hospedeiro	Origem	Referência
		ITS	LSU			
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst	G1TO99	AM269773	AM269830	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Itália	Guglielmo et al. (2007)
<i>Ganoderma resinaceum</i> Boud.	DP2	AM906060		<i>Celtis australis</i>	Itália	Guglielmo et al. (2008)
<i>Ganoderma resinaceum</i>	DP23	AM906061		<i>Platanus acerifolia</i> (Aiton) Willd.	Itália	Guglielmo et al. (2008)
<i>Ganoderma resinaceum</i>	CH 160999.3	EF060007		<i>Quercus rubra</i>	Alemanha	Terho et al. (2007)
<i>Ganoderma resinaceum</i>	G4/13		AM269837	n.a.	Itália	Guglielmo et al. (2007)
<i>Inonotus andersonii</i> (Ellis & Everh.) Cerný	T1545		AM269844	n.a.	EUA	Guglielmo et al. (2007)
<i>Inonotus andersonii</i>	SP23		AM269843	<i>Quercus wislizeni</i> A. DC.	EUA	Guglielmo et al. (2007)
<i>Inonotus cuticularis</i> (Bull.) P. Karst.	MF 97-97		AF311010	<i>Fagus sylvatica</i>	Alemanha	Wagner & Fischer (2002)
<i>Inonotus hispidus</i> (Bull.) P. Karst.	PF212	GU068592		<i>Styphnolobium japonicum</i> L.	Itália	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus hispidus</i>	MF 92-829		AF311014	<i>Fraxinus excelsior</i>	Alemanha	Wagner & Fischer (2002)
<i>Inonotus quercustris</i> M. Blackw. & Gilb.	Gilb. 11882		AY059050	<i>Quercus</i> sp.	EUA	Wagner & Fischer (2002)
<i>Inonotus rickii</i> (Pat.) D.A. Reid	HFUTA 0009/2014	KR905931		<i>Schinus molle</i>	Chile	Sepulveda-Chavera et al. (2015)
<i>Inonotus rickii</i>	URM 80460	KF147913		<i>Acacia richii</i>	Brasil	Cui et al. (2014)
<i>Inonotus rickii</i>	PF232(*)	HM362909		<i>Acer negundo</i> L.	Itália	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	CBS 304.78	HM362907		<i>Myrica cerifera</i> L.	EUA	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	PF241(*)	HM362908		<i>Acer negundo</i> L.	Espanha	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	PF243	HM362906		<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Grécia	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	PF244	HM362905		<i>Acer negundo</i>	Espanha	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	PF242	HM362904		<i>Acer negundo</i>	Espanha	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	PF241	HM362903		<i>Acer negundo</i>	Espanha	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	PF240	HM362902		<i>Acer negundo</i>	Espanha	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	PF41	HM362901		<i>Sambucus nigra</i> L.	Itália	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	PF44	HM362900		<i>Acer negundo</i>	Itália	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	PF232	GU111925		<i>Acer negundo</i>	Itália	Simone et al. (2011)

**Quadro 2.** (continuação da página anterior)

Espécie	Nome isolado	Nº acesso GenBank		Hospedeiro	Origem	Referência
		ITS	LSU			
<i>Inonotus rickii</i>	PF239	GU111924		<i>Myrica cerifera</i>	EUA	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	CBS 305.78	GU111923		<i>Myrica cerifera</i>	USA	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	PF216	GU111922		<i>Acer negundo</i>	Itália	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	PF231	GU111921		<i>Acer negundo</i>	Itália	Simone et al. (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	IFP 10359	FJ667753		<i>Hevea brasiliensis</i> L.	China	Dai et al. (2010)
<i>Inonotus rickii</i>	MQN022	AB811865		n.a.	Nepal	Bang et al. (2014)
<i>Inonotus rickii</i>	BAFC 31046	AY072025		<i>Casuarina cunninghamiana</i> L.	Argentina	Gottlieb et al. (2002)
<i>Inonotus rickii</i>	BAFC 34115	AY072027		<i>Acacia melanoxydon</i>	Argentina	Gottlieb et al. (2002)
<i>Inonotus rickii</i>	BAFC 3319	GU016326		<i>Platanus acerifolia</i> (Aiton) Willd.	Argentina	Robles et al. (2012)
<i>Inonotus rickii</i>	CAW-32	HQ589221		n.a.	Índia	Singh et al. (2010)
<i>Inonotus rickii</i>	CAW-28	HQ589217		n.a.	Índia	Singh et al. (2010)
<i>Inonotus rickii</i>	CAW-27	HQ589216		n.a.	Índia	Singh et al. (2010)
<i>Inonotus rickii</i>	n.a.	FJ860053		<i>Gleditsia triacanthos</i> L.	China	Dai et al. (2010)
<i>Inonotus rickii</i>	HAI 1240	GQ253461		n.a.	Índia	Singh et al. (2010)
<i>Inonotus ulmicola</i> Corfixen	PC 4072		AY059042	<i>Ulmus</i> sp.	Dinamarca	Wagner & Fischer (2002)
<i>Entoleuca mammata</i> (Wahlenb.) J.D. Rogers & Y.M. Ju <sup>a</sup>	Osterby 1	AF176983		<i>Populus tremula</i> L.	Suécia	Johannesson et. al (2000)
<i>Fomes fasciatus</i> (Sw.) Cooke <sup>b</sup>	FP-1061048-T		AM269825	<i>Carya</i> sp. Nutt.	EUA	Guglielmo et al. (2007)
<i>Fuscoporia ferruginosa</i> (Schrad.) Murrill <sup>b</sup>	MUCL 45983		DQ122397	n.a.	n.a.	Decock et al. (2007)
<i>Hypoxylon fragiforme</i> (Pers.) J. Kickx f. <sup>b</sup>	MUCL51264		KM186295	<i>Fagus sylvatica</i>	Alemanha	Daranagama et al. (2014)
<i>Inocutis tamaricis</i> (Pat.) Fiasson & Niemelä <sup>a</sup>	CBS 384.72	AY558604		n.a.	Turquemenistão	Jeong et al. (2005)
<i>Phellinus igniarius</i> (L.) Quél. <sup>a</sup>	85-625	AF515573		<i>Salix caprea</i> L.	Alemanha	Fischer (2002)
<i>Stereum hirsutum</i> (Willd.) Pers. <sup>a</sup>	TW 235	AF385165		<i>Fagus sylvatica</i>	Alemanha	Wagner & Fischer (2002)
<i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd <sup>a</sup>	DSH 93-197	U27080		n.a.	EUA	Hibbett & Donoghue (1995)

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Identificação de fungos lenhícolas com base nas características das frutificações

Com base nas características morfológicas das frutificações colhidas ao longo do presente trabalho, num total de 54 basidiomas em 57 amostras, e utilizando as chaves de Breitenbach & Kränzlin (1986) e de Gonthier & Nicolotti (2007), identificaram-se dez espécies de basidiomicetas e uma espécie de ascomiceta (Quadro 3). Devido à idade e ao mau estado de conservação do material colhido, no caso das amostras B014A, B017A B058A e B062A apenas foi possível chegar à identificação do género (B014A-*Trametes* sp., B017A-*Lenzites* sp., B058A e B062A-*Ganoderma* sp.); já para a frutificação da amostra B021 não foi possível chegar à determinação do género.

**Quadro 3.** Lista de géneros ou espécies identificadas com base nos caracteres morfológicos dos basidiomas (Breitenbach & Kränzlin, 1986; Gonthier & Nicolotti, 2007), respetivos hospedeiros e frequência com que foram encontradas (nº de amostras e de locais)

Espécie	Nº de amostras	Hospedeiros	Nº de locais
<b>Basidiomycota</b>			
<i>Fistulina hepatica</i>	1	<i>Quercus suber</i>	1
<i>Ganoderma australe</i>	5	<i>Apollonias barbujana</i> , <i>Celtis australis</i> , <i>Platanus</i> sp., <i>Schinus molle</i>	5
<i>Ganoderma resinaceum</i>	2	<i>Platanus</i> sp., <i>Ulmus</i> sp.	2
<i>Ganoderma</i> sp.	2	<i>Acer campestre</i> , <i>Ceratonia siliqua</i>	2
<i>Inonotus hispidus</i>	1	<i>Platanus</i> sp.	1
<i>Inonotus rickii</i>	23	<i>Celtis australis</i>	9
<i>Laetiporus sulphureus</i>	1	<i>Eucalyptus</i> sp.	1
<i>Lenzites</i> sp.	1	<i>Fraxinus</i> sp.	1
<i>Phellinus pomaceus</i>	3	<i>Prunus</i> sp., <i>Styphnolobium japonicum</i>	3
<i>Phellinus punctatus</i>	4	<i>Buxus sempervirens</i> , <i>Cercis siliquastrum</i> , <i>Pittosporum undulatum</i> , <i>Platanus</i> sp.	3
<i>Phellinus torulosus</i>	5	<i>Acacia</i> sp., <i>Cupressus lusitanica</i> , <i>Eucalyptus</i> sp., <i>Fraxinus</i> sp., <i>Robinia pseudoacacia</i>	3
<i>Schizophyllum commune</i>	2	<i>Celtis australis</i>	1
<i>Trametes</i> sp.	1	<i>Fraxinus</i> sp.	1
<b>Ascomycota</b>			
<i>Daldinia concentrica</i>	3	<i>Citrus</i> sp., <i>Celtis australis</i> , <i>Fraxinus</i> sp.	3
<b>TOTAL</b>	<b>54</b>	<b>19</b>	<b>20</b>

Da análise do quadro sobressai a presença do fungo *Inonotus rickii*, assinalado em Portugal por Melo et al. (2002). Este basidiomiceta é agente causal de podridão branca do

cerne em folhosas, doença que na cidade de Lisboa afeta especialmente lódãos-bastardos, tendo nos últimos anos levado à quebra de pernas ou à morte de exemplares de porte considerável (Ramos et al., 2008; 2016). No decurso do presente trabalho foi possível observar e colher quer frutificações da forma sexuada de *I. rickii*, quer massas de clamidósporos da forma assexuada *Ptychogaster cubensis* (Fig. 7). A facilidade com que este basidiomiceta diferencia a forma assexuada, facilita a identificação do fungo em causa, sobretudo se for tida em conta a sintomatologia que causa nos hospedeiros (Ramos et al., 2008). Este basidiomiceta da família Hymenochaetaceae encontra-se assinalado em diversas espécies de angiospérmicas lenhosas, em países tropicais e sub-tropicais, parecendo prevalecer nas zonas urbanas nos países de climas temperados (Intini, 2002). Na Europa, para além de ter sido descrito em Portugal, foi também assinalado em Espanha, França, Grécia e Itália (Intini & Tello, 2003).



**Figura 7.** Colheita de massa de clamidósporos de *Ptychogaster cubensis* na base de *Celtis australis* (à esquerda) e pormenor de basidioma de *Inonotus rickii* no tronco da mesma árvore.

Os carpóforos observados no decurso do presente trabalho que vieram a ser identificados como pertencentes ao género *Ganoderma* (total de nove amostras) apresentavam basidiomas sésseis, resupinados a pileados com himénio poróide (poros redondos ou quase redondos) de cor branco a creme, oriundos de espécies folhosas. Os basidiomas das amostras B004, B016, B055, B057 e B061 por serem mais aplanados, com zonagem na face superior do himénio e sem separação dos poros em relação ao contexto do basidioma, foram identificados como *G. australe* (sin. *G. adspersum*) (Fig. 8). Quando a parte superior do basidiocarpo se apresentava coberta por uma fina película brilhante, avermelhada e semelhante a verniz, o fungo foi identificado como *G. resinaceum* (amostras B035 e B060) (Fig. 8). As amostras B053 e B062 foram identificadas apenas como *Ganoderma* sp. porque, apesar dos esporos observados serem característicos do género (esporos corados de castanho com superfície ligeiramente equinulada), os corpos frutíferos encontravam-se já muito degradados, não tendo mesmo sido possível o seu isolamento.



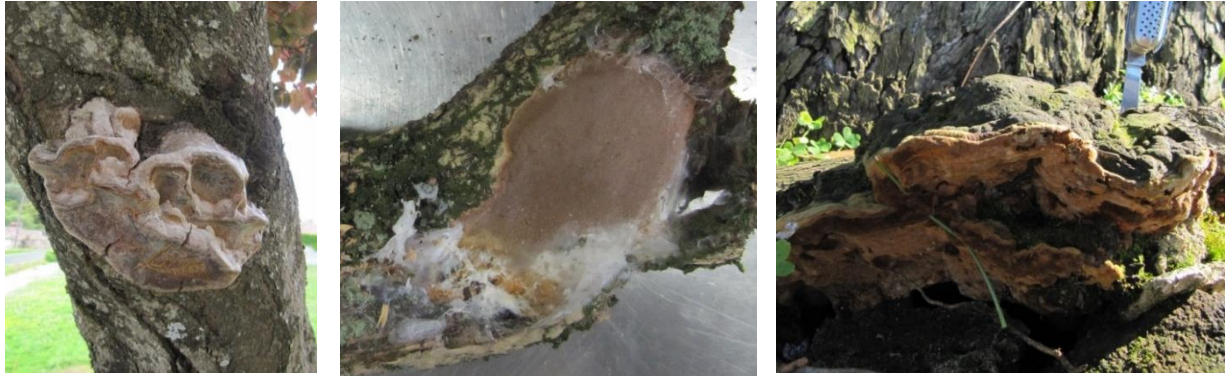
**Figura 8.** Basidiomas de *Ganoderma australe* na base de *Apollonias barbujana* (à esquerda) e de *Ganoderma resinaceum* no tronco de um ulmeiro.

Os fungos do género *Ganoderma* são frequentemente relacionados com a rutura de árvores, especialmente pela zona do colo e do sistema radicular (Lonsdale 1999; Schwarze et al., 2000; Passola, 2011). Afetam espécies de folhosas, ainda que algumas coníferas possam ser atacadas, em ambientes muito variados. Estes fungos causam podridão branca do lenho mas podem encontrar-se diferenças na forma como as paredes celulares do hospedeiro são atacadas, com algumas espécies de *Ganoderma* a serem responsáveis por deslinhificação seletiva e outras por podridão branca simultânea (Schwarze & Ferner 2003). Diversos micologistas têm dedicado a sua atenção a este género da família Ganodermataceae que apresenta grande variabilidade intraespecífica morfológica e genética (Seo & Kirk, 2000). A espécie tipo da família é *G. lucidum* e as espécies *G. australe* (sin. *adpersum*), *G. lipsiense* (sin. *G. applanatum*), *G. cupreolaccatum* (sin. *G. pfeifferi*) e *G. resinaceum*, presentes sobretudo em ambientes urbanos e peri-urbanos (Schwarze et al., 2000), são atualmente descritas como espécies polifiléticas (Seo & Kirk, 2000; Moncalvo et al., 2000). Para Smith & Sivasithamparam (2000) é mesmo urgente que se proceda à neotipificação das espécies *G. australe* e *G. lipsiense*. Com efeito, com base na análise filogenética da região ITS do rDNA e na proveniência geográfica de mais de 300 isolados, Moncalvo et al. (2000) descrevem a existência de três grandes grupos de espécies dentro do género *Ganoderma*. No Grupo 1 Moncalvo et al. (2000) descrevem os complexos *G. lucidum* s.s. (*sensu stricto*) e *G. resinaceum* s.l. (*sensu lato*). O primeiro destes complexos parece estar presente sobretudo na Europa e na América do Norte, afetando quer folhosas quer coníferas, ao passo que *G. resinaceum* s.l. é predominante no continente asiático e na Austrália, ainda que alguns isolados sejam provenientes da Europa e da África do Sul. Segundo aquele autor, *G. resinaceum* s.l. afeta unicamente espécies de dicotiledóneas lenhosas. No Grupo 2 ficam agregados isolados que afetam plantas da família Arecaceae, identificados como *Ganoderma zonatum* Murrill ou *Ganoderma boninense* Pat., bem como

isolados não identificados à espécie, obtidos a partir de espécies de folhosas com origem geográfica muito variada. Por fim, no Grupo 3 Moncalvo et al. (2000) agregam os isolados que constituem o complexo *G. australe-applanatum* s.l., onde se inserem os isolados normalmente identificados como *G. applanatum* ou como *G. australe*. De referir ainda que segundo este autor, dentro de *G. australe* podem distinguir-se três complexos, correspondendo a grupos filogeneticamente distintos ainda que muito próximos. No complexo A de *G. australe* encontram-se isolados oriundos de países asiáticos bem como da Florida (EUA), que afetam quer espécies folhosas quer palmeiras; já os isolados dos complexos B e C de *G. australe* parecem só afetar folhosas e enquanto o complexo B está presente apenas no hemisfério Sul (África do Sul, América do Sul, Austrália e Nova Zelândia), os isolados pertencentes ao complexo C encontram-se também no continente asiático.

O género *Phellinus* s.l. representa o maior grupo dentro da ordem Hymenochaetales e estudos recentes mostram que é polifilético, compreendendo diversos géneros, entre os quais *Fuscoporia* e *Fomitiporia* (Wagner & Fischer, 2002). Para Fischer & Binder (2004), *Phellinus* s.s. está por enquanto limitado ao grupo *P. igniarius*. Outros grupos estão divididos do seguinte modo: *Fomitiporia* no grupo *Phellinus robustus* (P. Karst.) Bourdot & Galzin, *Porodaedalea* no grupo *P. pini* e *Fuscoporia* no grupo *Phellinus ferruginosus* (Schrad.) Pat.. São portanto reconhecidas de um modo geral 150 espécies de *Phellinus* (Fischer & Binder, 2004). Os fungos deste género causam podridão branca do lenho e foram recolhidas 12 amostras que viriam a ser identificadas como *P. pomaceus* (três amostras), *P. punctatus* (quatro amostras) e *P. torulosus* (cinco amostras) (Fig. 9). A espécie *P. pomaceus* (sin. *P. tuberculosus* (Baumg.) Niemelä) (Hymenochaetaceae) afeta folhosas e habitualmente os seus basidiomas são visíveis no topo dos ramos ou associados a feridas. A presença de linhas pretas no lenho em deterioração avançada é muito característica na podridão branca causada por este fungo e corresponde à formação por parte do hospedeiro da barreira 4 de compartimentação (Schwarze et al., 2000). As amostras B040, B051 e B056 foram identificadas como pertencentes a esta espécie devido aos agregados de basidiomas duros, lenhosos, unglados, com superfície sulcada castanha e interior com aspeto ferrugento (Horst, 2001; Passola, 2011). Já os basidiomas de *P. punctatus* (amostras B003, B019, B022 e B037) têm um aspeto de crosta, são aplanados, lenhosos, com a face superior zonada e sulcada com coloração acastanhada. São frutificações anuais, crescendo camada sobre camada sendo que, alguns exemplares com vários anos podem ser confundidos com *P. pomaceus*. Este fungo é frequentemente encontrado em ramos e troncos mortos ou debilitados (Passola, 2011). As amostras B010, B018, B020, B023 e B050 foram identificadas como *P. torulosus*, que é muito frequente quer em folhosas quer em coníferas, crescendo em toiças e na zona do colo e de raízes deterioradas. O carpóforo apresenta uma

forma de prateleira achatada, semicircular, levemente côncava, com uma superfície tomentosa e normalmente forma agregados resupinados. A sua coloração é inicialmente de ferrugem, tornando-se mais tarde castanho-escuro, com uma margem arredondada castanho-clara (Intini, 1990; Passola, 2011).



**Figura 9.** Basidiomas de *Phellinus pomaceus* no tronco de *Prunus* sp. (à esquerda), *Phellinus punctatus* em ramo de *Buxus sempervirens* (no centro) e *Phellinus torulosus* no colo de *Acacia* sp. (à direita).

O fungo *Inonotus hispidus* está presente em diversas espécies de folhosas (acácia-bastarda, castanheiro-da-índia, freixo, sófora, plátano, entre outras) na zona de Lisboa (Caetano, 1995; Ramos et al., 2011) (Fig. 10). É agente causal de podridão branca e de cancro nas zonas em que frutifica (Schwarze, 2000). Os basidiomas de *I. hispidus* são anuais e formam-se de julho a setembro, acima dos 2 m de altura, no tronco ou nas pernas, com frequência associados a lesões; apresentam uma forma característica em prateleira, com 10 a 30 cm de diâmetro, com a bordadura ligeiramente ondulada; a face superior apresenta uma coloração vermelho-amarelado e é fortemente tomentosa, com pêlos curtos e densos; mais tarde adquire coloração vermelho-acastanhado, passa a vermelho escuro a castanho e por fim fica negra (Passola, 2011). A esporada é castanha. Inicialmente os corpos frutíferos são tão suculentos que podem ser espremidos e é habitual verem-se gotas alaranjadas de líquido, que escorrem a partir da face inferior do himénio. No decurso do presente trabalho, apesar de se ter observado grande número de carpóforos de *I. hispidus*, não foi possível obter culturas puras do mesmo, quer porque os basidiomas observados já se encontravam em avançado estado de degradação quer por se encontrarem associados a ramos altos a que não foi possível aceder para fazer a colheita.

Importa ainda referir a ocorrência de *Laetiporus sulphureus* (sin. *Polyporus sulphureus*), fungo da família Fomitopsidaceae, raramente visto mas que afeta tanto folhosas como coníferas (Fig. 10). É causador de podridão castanha e as suas frutificações anuais aveludadas têm coloração laranja-amarelado quando jovens e mais tarde esbranquiçadas, libertando uma esporada alaranjada a laranja-acastanhada fruto de grande

acumulação de clamidósporos (Stalpers, 1978; Schwarze et al., 2000). Em laboratório não se conseguiu o seu isolamento em cultura pura.

Para além dos fungos Basidiomycota referidos anteriormente notou-se também a presença de um Ascomycota em algumas folhosas, pertencente à espécie *Daldinia concentrica* (Xylariaceae) (amostras B008, B036 e B054). Este fungo é causador de podridão e frutificando sobretudo em troncos mortos e tecidos já debilitados, sendo que os seus ascocarpos só se formam em algumas espécies. Estas frutificações libertam uma esporada negra, apresentam uma textura dura e fibrosa, um aspeto liso e brilhante e uma coloração castanha-arroxeadas mas que rapidamente passa a negra (Intini, 1990; Passola, 2011).



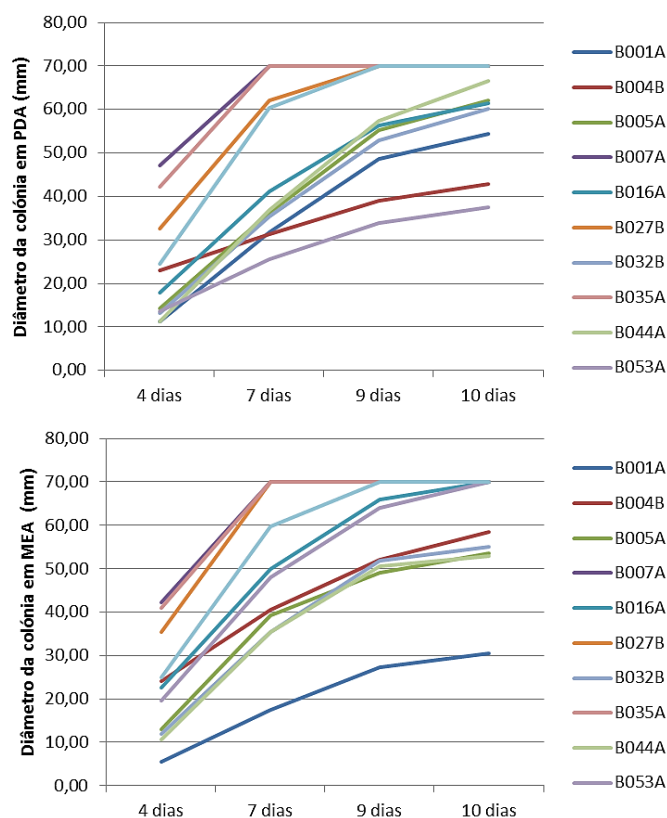
**Figura 10.** Basidiomas de *Inonotus hispidus* em tronco de *Platanus* sp. (à esquerda) e de *Laetiporus sulphureus* na base de um eucalipto (ao centro). À direita é possível observar os corpos frutíferos de *Daldinia concentrica* em tronco de *Celtis australis*.

### 3.2. Influência do meio de cultura no crescimento micelial

A análise do crescimento das colónias dos 11 isolados estudados (c.f. cap. 2.5.) à temperatura de 25 °C nos meios de PDA e MEA, permitiu obter informações sobre a interação verificada entre o isolado em causa, o tempo de incubação e o meio de cultura.

A variação do diâmetro da colónia em função do tempo de incubação é constante nos dois meios testados até ao 7º dia (Fig. 11), verificando-se que ao final deste período os isolados B007A e B035A já haviam atingido o rebordo da placa.

Desta forma, e porque se pretendia encontrar um tempo de incubação que permitisse um máximo de desenvolvimento das colónias mantendo o poder discriminante entre meios de cultura, procedeu-se à análise estatística para o diâmetro das colónias ao fim de sete dias de incubação, verificando-se que existem diferenças significativas entre isolados para ambos os meios, em resultado ANOVA (Quadros 4, 5 e 6), seguida de teste de comparação de médias (teste de Tukey, a 95 % de confiança).



**Figura 11.** Gráficos ilustrativos do crescimento das colônias dos 11 isolados em estudo (sete isolados de *Inonotus rickii* – B001A, B004B, B005A, B007A, B027B, B032B, B044A; quatro isolados de *Ganoderma* spp. – B016A, B035A, B053A, B057A), em função do meio de cultura (PDA e MEA, respetivamente) e do tempo de incubação (4, 7, 9 e 10 dias), à temperatura de 25 °C.

**Quadro 4.** Resultados da análise de variância ANOVA a dois fatores (isolado e meio), efeitos fixos,  $\alpha=0,05$ , para a variável “diâmetro da colônia” (mm) em PDA e MEA, após sete dias de incubação à temperatura de 25 °C

	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p-value
<b>Isolado</b>	10	3186,30	1167,00	0,00
<b>Meio</b>	1	327,80	120,00	0,00
<b>Interação</b>	10	250,10	91,60	0,00
<b>Erro</b>	110	2,70		

Apesar das diferenças encontradas entre isolados para cada meio de cultura, não foi possível discriminar entre isolados de *Inonotus rickii* e de *Ganoderma* spp. com base no crescimento micelial ao final de sete dias de incubação (Fig. 12). Ainda assim, observa-se que de uma forma geral os isolados apresentam maior crescimento micelial em meio MEA (significativamente diferentes a 95 % de confiança), à exceção do isolado B001A que cresceu significativamente melhor em PDA. Esta preferência pelo meio de MEA é mais acentuada no caso dos isolados do género *Ganoderma* do que nos de *I. rickii*.

Segundo Simone et al. (2011) *I. rickii* exhibe maiores crescimentos miceliais em PDA à temperatura de 35 °C. No entanto, estes autores referem a existência de grande

variabilidade entre isolados de diferentes origens geográficas, nomeadamente no que diz respeito à taxa de crescimento à temperatura de 25 °C. Ainda de acordo com estes autores, isolados de *I. rickii*/*P. cubensis* oriundos do sul de Espanha, Grécia e Itália, exibem maiores taxas de crescimento e capacidade de crescer a temperaturas superiores a 35 °C, quando comparados com isolados provenientes de locais de climas mais frios. De forma geral, os isolados testados no presente trabalho apresentam, à temperatura de 25 °C, uma taxa de crescimento superior à indicada por Simone et al. (2011).

Quanto aos isolados do género *Ganoderma* testados os valores de crescimento micelial registados em MEA são coerentes com os indicados por Ell-Fallal et al. (2015) para *Ganoderma resinaceum* e por Kapoor & Sharma (2014) para *Ganoderma* spp..

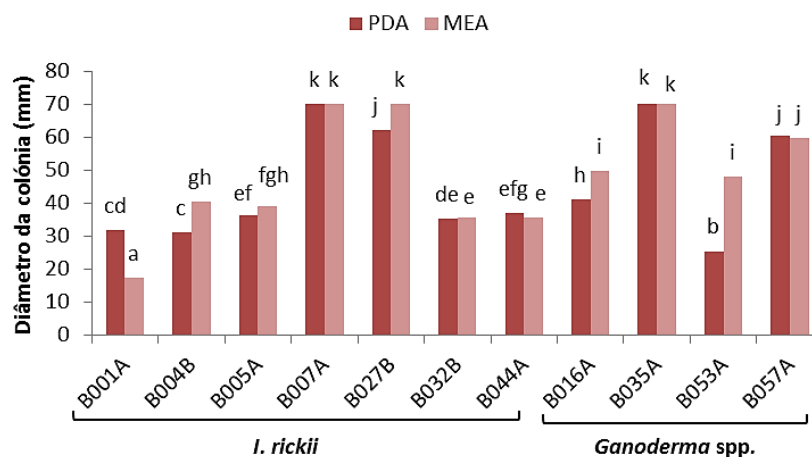
**Quadro 5.** Resultados da análise de variância ANOVA a um fator (isolado), efeitos fixos,  $\alpha=0,05$ , para a variável “diâmetro da colónia” (mm) em PDA e MEA, após sete dias de incubação à temperatura de 25 °C

	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F</b>	<b>p-value</b>
<b>Meio PDA</b>				
<b>Isolado</b>	10	1658,50	684,13	0,00
<b>Erro</b>	55	2,40		
<b>Meio MEA</b>				
<b>Isolado</b>	10	1777,90	585,53	0,00
<b>Erro</b>	55	3,00		

**Quadro 6.** Distribuição dos isolados de *Inonotus rickii* e *Ganoderma* spp. por grupos homogêneos de acordo com teste de comparação de médias (Tukey, 95 % de confiança) realizado para o diâmetro das colónias (mm) em PDA e MEA, respetivamente, após incubação durante sete dias na obscuridade a 25 °C

<b>Meio PDA</b>				<b>Meio MEA</b>			
<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Média</b>	<b>Grupos homog.*</b>	<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Média</b>	<b>Grupos homog.*</b>
<i>Ganoderma</i> sp.	<b>B053A</b>	25,50	a	<i>Inonotus rickii</i>	<b>B001A</b>	17,50	a
<i>Inonotus rickii</i>	<b>B004B</b>	31,33	b	<i>I. rickii</i>	<b>B044A</b>	35,50	b
<i>I. rickii</i>	<b>B001A</b>	31,83	b	<i>I. rickii</i>	<b>B032B</b>	35,50	b
<i>I. rickii</i>	<b>B032B</b>	35,33	c	<i>I. rickii</i>	<b>B005A</b>	39,17	c
<i>I. rickii</i>	<b>B005A</b>	36,33	c	<i>I. rickii</i>	<b>B004B</b>	40,50	c
<i>I. rickii</i>	<b>B044A</b>	37,00	c	<i>Ganoderma</i> sp.	<b>B053A</b>	48,00	d
<i>G. australe</i>	<b>B016A</b>	41,17	d	<i>G. australe</i>	<b>B016A</b>	49,83	d
<i>G. australe</i>	<b>B057A</b>	60,33	e	<i>G. australe</i>	<b>B057A</b>	59,67	e
<i>I. rickii</i>	<b>B027B</b>	62,17	e	<i>I. rickii</i>	<b>B007A</b>	70,00	f
<i>I. rickii</i>	<b>B007A</b>	70,00	f	<i>I. rickii</i>	<b>B027B</b>	70,00	f
<i>G. resinaceum</i>	<b>B035A</b>	70,00	f	<i>G. resinaceum</i>	<b>B035A</b>	70,00	f

\* Em cada coluna, isolados com uma ou mais letras em comum não diferem significativamente para esta característica.



**Figura 12.** Diâmetro das colônias dos 11 isolados em estudo em função do meio de cultura (PDA e MEA) ao fim de sete dias de incubação, à temperatura de 25 °C (colunas com uma ou mais letras em comum não diferem significativamente para esta característica).

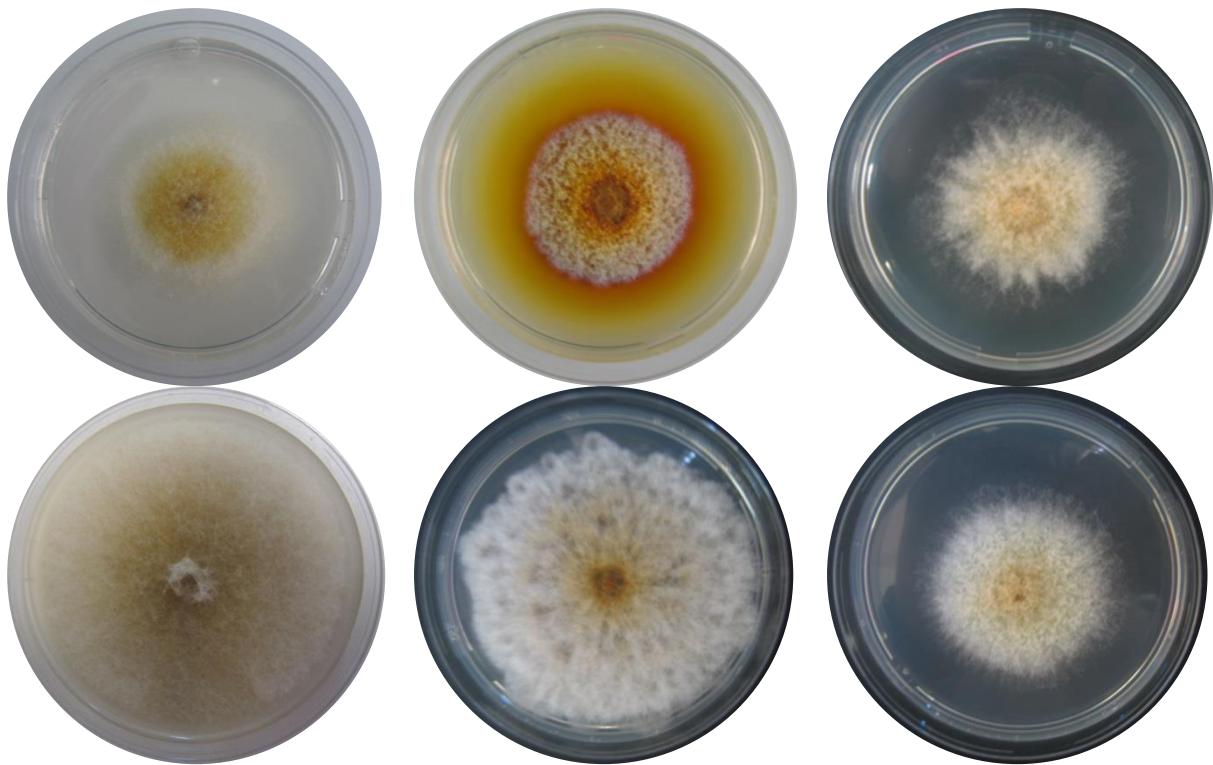
### 3.3. Caracterização cultural e morfológica

Após o ensaio de crescimento as culturas foram observadas macro e microscopicamente para se proceder à descrição das características das colônias em PDA e em MEA, bem como para observar caracteres morfológicos específicos de cada grupo de isolados (Anexo 4, Quadro 4.1. e Quadro 4.2.).

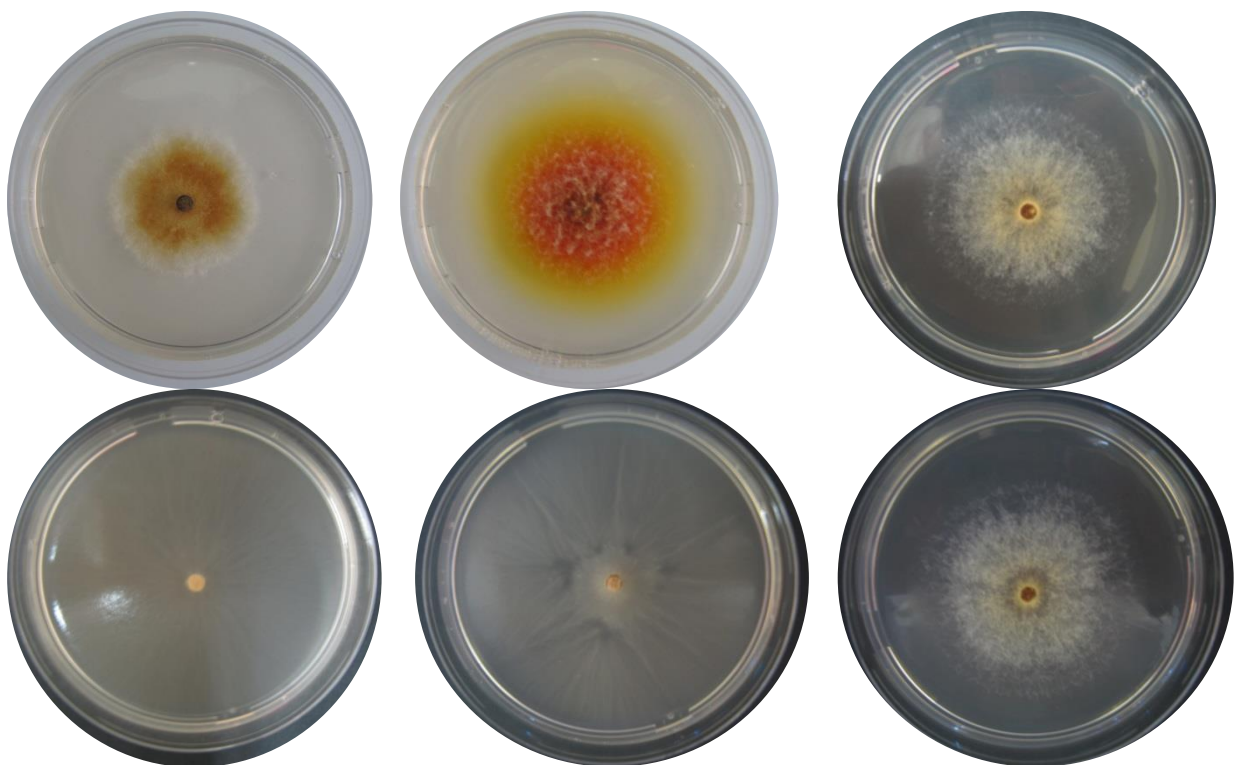
Olhando para o conjunto de isolados nos dois meios testados é evidente que a densidade micelial das colônias é superior em PDA quando comparada com a de MEA (Figs. 13 a 16). No caso dos isolados de *I. rickii* é de notar uma maior variabilidade no aspeto cultural, entre os isolados, quando comparados com os quatro isolados de *Ganoderma* spp.

Em meio de cultura PDA os isolados de *I. rickii* apresentam colônias de densidade média, com aspeto feltroso a cottonoso, com o centro cottonoso, à exceção dos isolados B007A e B027B que apresentam micélio feltroso forte e cottonoso fraco, respetivamente. Em meio PDA, a coloração apresentada pelas culturas de *I. rickii* é variada mas os tons predominantes vão do castanho aos amarelos ou dos amarelos aos cremes na margem da colónia. Entre os isolados testados o isolado B004B é o que mais se destaca em termos de coloração das colônias (em PDA mas também em MEA) pela presença no centro da colónia de pigmento amarelo-alaranjado a púrpura na face inferior. As características observadas são concordantes com as de Chang & Fu (1998) e Ramos et al. (2008).

Em relação às estruturas microscópicas, na maior parte dos isolados foi evidente a presença abundante de clamidósporos, por vezes formados em cadeia, e também de algumas sedas (Fig. 17).



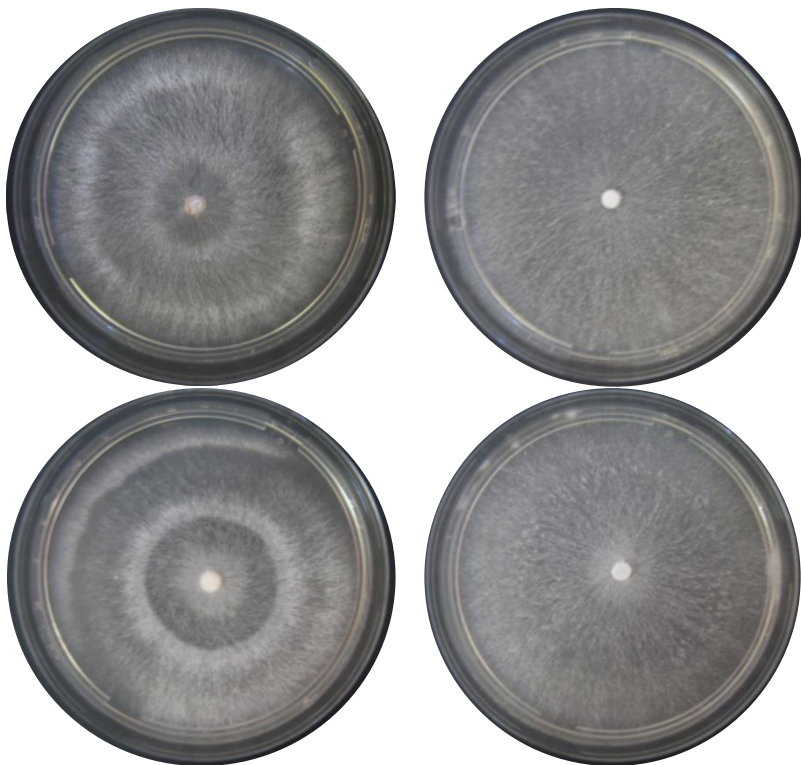
**Figura 13.** Colônias de *Inonotus rickii* após 10 dias de crescimento em meio de PDA a 25 °C na obscuridade (da esquerda para a direita e de cima para baixo: isolados B001A, B004B, B005A, B007A, B027B e B044A).



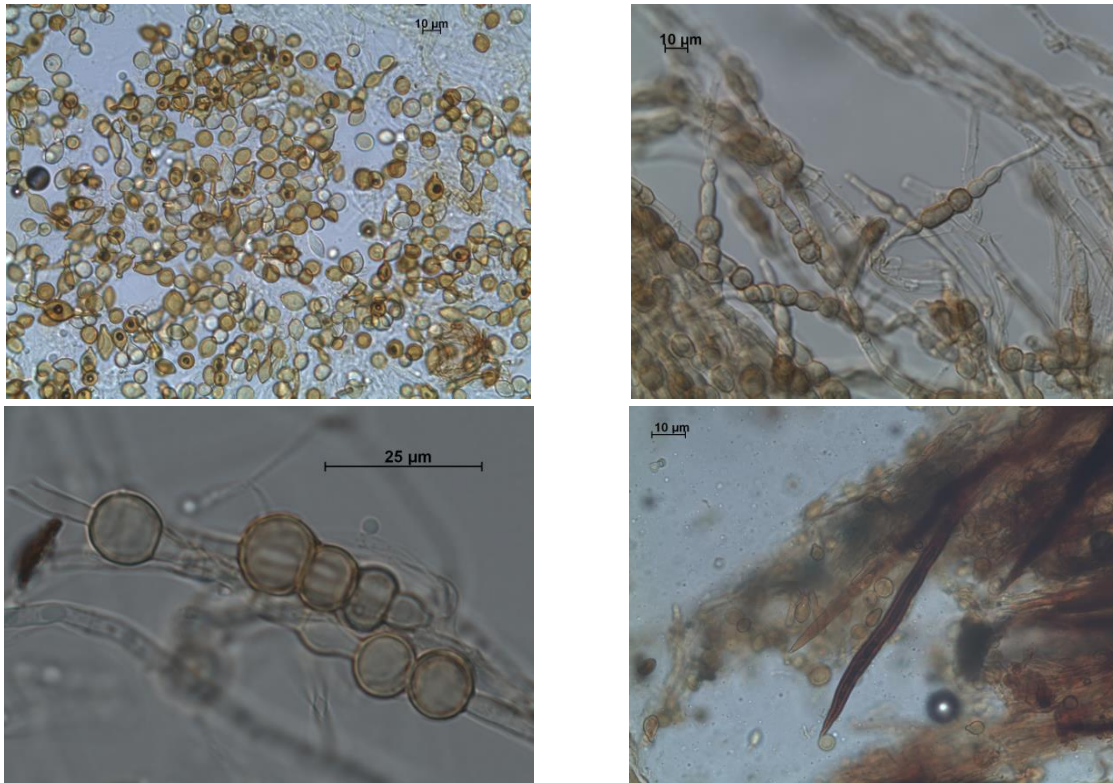
**Figura 14.** Colônias de *Inonotus rickii* após 10 dias de crescimento em meio de MEA a 25 °C na obscuridade (da esquerda para a direita e de cima para baixo: isolados B001A, B004B, B005A, B007A, B027B e B032B).



**Figura 15.** Colónias de *Ganoderma* spp. após 10 dias de crescimento em meio de PDA a 25 °C na obscuridade (da esquerda para a direita e de cima para baixo: isolados B016A, B035A, B053A e B057A).

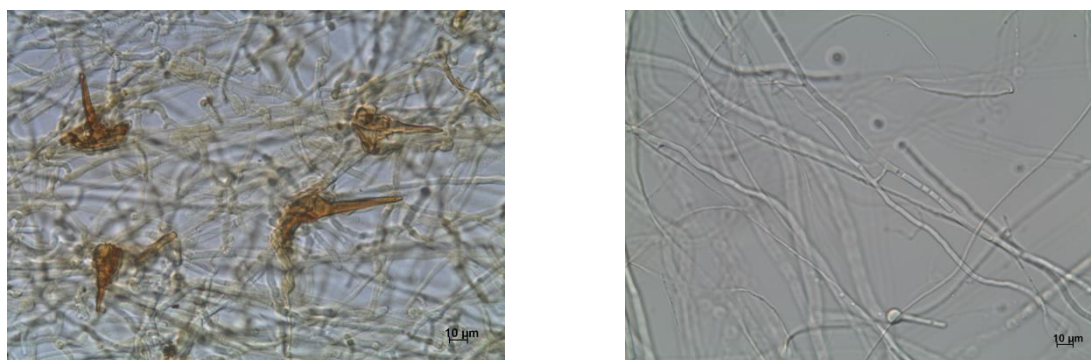


**Figura 16.** Colónias de *Ganoderma* spp. após 10 dias de crescimento em meio de MEA a 25 °C na obscuridade (da esquerda para a direita e de cima para baixo: isolados B016A, B035A, B053A e B057A).



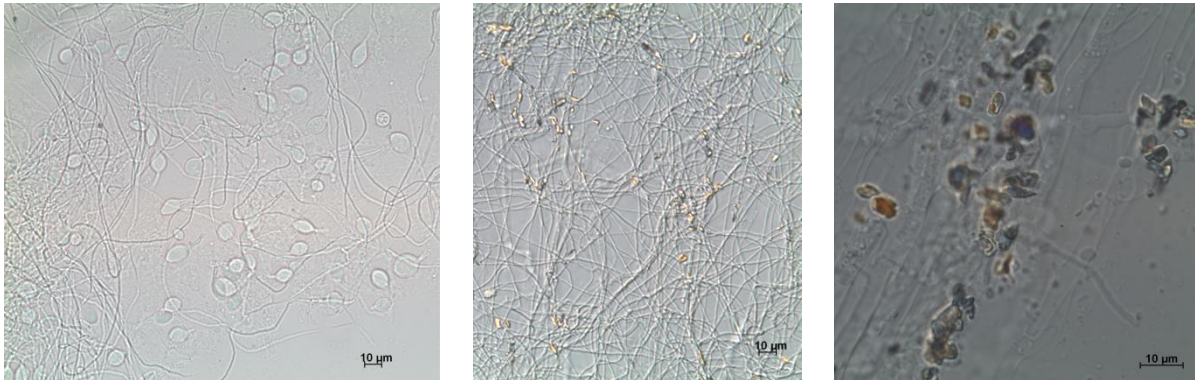
**Figura 17.** Clamidósporos e sedas (em baixo, à direita) formados em colónias de *Inonotus rickii* em meio PDA após 10 dias de incubação a 25 °C (da esquerda para a direita e de cima para baixo, isolados B032B, B027B, B007A e B004B).

Já em meio de MEA as colónias de *I. rickii* apresentam densidade fraca, aspeto feltroso a feltroso fraco, colorações castanho-amareladas, amarelas ou cremes. Exibem assim um aspeto geral que é consentâneo com as descrições de Stalpers (1978) e de Ramos et al. (2008). A presença de clamidósporos e sedas neste meio é menos frequente e menos abundante do que em PDA. Acresce ainda que as sedas formadas em MEA são ligeiramente diferentes das observadas em PDA, em geral dilatadas na base e menos coradas. Observaram-se ainda grampos de conexão tanto adjacentes como em extensão. Curiosamente Stalpers (1978) na sua chave dicotómica refere expressamente a ausência de grampos de conexão em *I. rickii*.



**Figura 18.** Aspeto de sedas (à esquerda) e de grampos de conexão (à direita) em colónias de *Inonotus rickii* (isolados B001A e B007A, respetivamente), com 10 dias de crescimento em meio MEA, à temperatura de 25 °C.

Em meio PDA as colónias dos isolados do género *Ganoderma* apresentam aspeto feltroso fraco a feltroso forte, densidade média a forte, e coloração entre o branco e o amarelo, características em tudo semelhantes às descritas por Seo & Kirk (2000) para *G. australe* e *G. resinaceum*. A observação de clamidósporos foi rara e nunca se detetou a formação de grampos de conexão (Fig. 19). Segundo Seo & Kirk (2000) a formação de clamidósporos ocorre sobretudo em isolados de *G. lucidum* com crescimento rápido em PDA.



**Figura 19.** Micélio e esporos do isolado B035A (*G. resinaceum*), em meio PDA (à esquerda), micélio do isolado B016A (*G. australe*) em meio MEA (ao centro) e cristais formados em colónias do isolado B053A (*Ganoderma* sp.) em meio MEA (à direita); colónias com 10 dias de crescimento, à temperatura de 25 °C.

Em meio MEA, os isolados de *Ganoderma* spp. apresentam colónia com baixa densidade, aspeto feltroso ou pulverulento e coloração branca ou creme, dados que são sustentados por Stalpers (1978). O micélio é muito fino e a presença de cristais foi frequente. O isolado B035A, *G. resinaceum*, é o que apresenta maiores diferenças para este meio em relação ao meio de PDA, tanto no aspeto cultural, passando a ser pulverulento, em vez de feltroso como na zonagem que deixa de existir.

### 3.4. Caraterização molecular

Do total de 76 isolados obtidos no decurso do presente trabalho procedeu-se à extração de DNA, amplificação e sequenciação da região ITS do DNA ribossomal de 35 isolados. Obtiveram-se igualmente as sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA de dois isolados oriundos da micoteca do LPVVA (isolados B012A e B053A) e dos isolados referência oriundos da coleção INIAV (isolados GR475, GR571, GR572 e GR573) (Quadro 7). As sequências obtidas foram editadas e submetidas através da ferramenta BLAST a confronto com a base de dados pública do NCBI, para identificação à espécie dos isolados em causa (Quadro 7).

**Quadro 7.** Lista de isolados para os quais se obtiveram sequências das regiões ITS e LSU do DNA ribossomal, com a respetiva identificação com base nas características dos basidiomas e por confronto com a base de dados pública NCBI, com recurso à ferramenta BLAST

Código isolado	Género/Espécie <sup>(a)</sup>	Identificação molecular (BLAST)			
		ITS <sup>(b)</sup>	Homologia <sup>(c)</sup>	LSU <sup>(b)</sup>	Homologia <sup>(c)</sup>
B001A	<i>Inonotus rickii</i>	<i>Inonotus rickii</i>	93%	<i>Inonotus rodwayi</i>	90%
B001C	<i>I. rickii</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%		
B003B	<i>Phellinus punctatus</i>	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	96%	<i>Fomitiporia pseudopunctata</i>	99%
B003C	<i>P. punctatus</i>	<i>Umbelopsis isabellina</i>	99%		
B003D	<i>P. punctatus</i>	<i>Simplicillium lamellicola</i>	98%		
B004A	<i>Ganoderma australe</i>	<i>Fusarium sp.</i>	99%		
B005A	<i>I. rickii</i>	<i>I. rickii</i>	98%	<i>Inonotus andersonii</i>	97%
B006A	<i>I. rickii</i>	<i>Fusarium sp.</i>	99%		
B006B	<i>I. rickii</i>	<i>Fusarium sp.</i>	99%		
B007A	<i>I. rickii</i>	<i>Fusarium sp.</i>	99%		
B008A	<i>Daldinia concentrica</i>	<i>Daldinia concentrica</i>	99%	<i>Daldinia childiae</i>	99%
B009A	<i>Fistulina hepatica</i>	<i>U. isabellina</i>	99%		
B012A*	<i>Pleurotus sp.</i>	<i>Clitopilus pinsitus</i>	98%		
B013A	<i>n.i.</i>	<i>Glomerella acutata</i>	99%		
B014A	<i>Trametes sp.</i>	<i>Corioloopsis trogii</i>	99%	<i>Corioloopsis gallica</i>	99%
B016A	<i>G. australe</i>	<i>Ganoderma adspersum</i>	99%	<i>Ganoderma applanatum</i>	99%
B017A	<i>Lenzites sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	99%		
B019A	<i>P. punctatus</i>	<i>F. mediterranea</i>	78%	<i>F. pseudopunctata</i>	99%
B021A	<i>n.i.</i>	<i>Pestalotiopsis maculiformans</i>	99%		
B021B	<i>n.i.</i>	<i>U. isabellina</i>	99%		
B023A	<i>P. torulosus</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	100%		
B027B	<i>I. rickii</i>	<i>Fusarium sp.</i>	99%		
B031A	<i>I. rickii</i>	<i>I. rickii</i>	99%	<i>I. andersonii</i>	98%
B034A	<i>I. rickii</i>	<i>Fusarium sp.</i>	99%		
B035A	<i>Ganoderma resinaceum</i>	<i>Ganoderma resinaceum</i>	99%	<i>Ganoderma lingzhi</i>	97%
B036A	<i>D. concentrica</i>	<i>D. concentrica</i>	99%	<i>D. childiae</i>	99%
B038A	<i>I. rickii</i>	<i>Phoma pedaeiae</i>	99%		
B038B	<i>I. rickii</i>	<i>Fusarium sp.</i>	99%		
B039A	<i>I. rickii</i>	<i>Fusarium equiseti</i>	99%		
B047A	<i>I. rickii</i>	<i>I. rickii</i>	77%	<i>I. quercustris</i>	79%
B050A	<i>P. torulosus</i>	<i>Phoma exigua var. exigua</i>	99%		
B053A*	<i>Ganoderma sp.</i>	<i>Ganoderma australe</i>	98%	<i>G. applanatum</i>	99%
B054A	<i>D. concentrica</i>	<i>D. concentrica</i>	99%	<i>Daldinia childiae</i>	99%
B055A	<i>G. australe</i>	<i>Arthrinium marii</i>	100%		
B059A	<i>I. rickii</i>	<i>I. rickii</i>	98%	<i>I. andersonii</i>	97%
B060A	<i>G. resinaceum</i>	<i>G. resinaceum</i>	99%	<i>G. lingzhi</i>	99%
B061A	<i>G. australe</i>	<i>G. resinaceum</i>	99%	<i>G. lingzhi</i>	94%
GR475**	<i>G. resinaceum</i>	<i>G. resinaceum</i>	99%	<i>G. applanatum</i>	99%

**Quadro 7.** (continuação da página anterior)

Código isolado	Gênero/Espécie <sup>(a)</sup>	Identificação molecular (BLAST)			
		ITS <sup>(b)</sup>	Homologia <sup>(c)</sup>	LSU <sup>(b)</sup>	Homologia <sup>(c)</sup>
GR571**	<i>G. resinaceum</i>	<i>G. resinaceum</i>	99%	<i>Ganoderma lucidum</i>	99%
GR572**	<i>G. resinaceum</i>	<i>G. resinaceum</i>	99%	<i>G. resinaceum</i>	93%
GR573**	<i>G. resinaceum</i>	<i>G. resinaceum</i>	99%	<i>G. applanatum</i>	99%

<sup>(a)</sup> Identificação com base em Breitenbach & Kränzlin (1986) e Gonthier & Nicolotti (2007); <sup>(b)</sup> identificação molecular por confronto com a base de dados NCBI, com recurso à ferramenta BLAST; n.i. não identificado; \* isolados provenientes da micoteca do LPVVA; \*\* isolados-referência provenientes da micoteca do INIAV. <sup>(c)</sup> Homologia (em %) segundo a identificação fornecida pela base de dados NCBI.

Após a edição e alinhamento das sequências obtidas, foi executada uma análise filogenética para os gêneros de maior interesse para este trabalho: *Inonotus*, *Ganoderma*, *Phellinus* e *Daldinia*, cujos resultados se apresentam de seguida. Nessa análise filogenética incluíram-se diversas sequências referência depositadas na base de dados do NCBI (cap. 2, Quadro 2) para a elaboração das respetivas árvores filogenéticas.

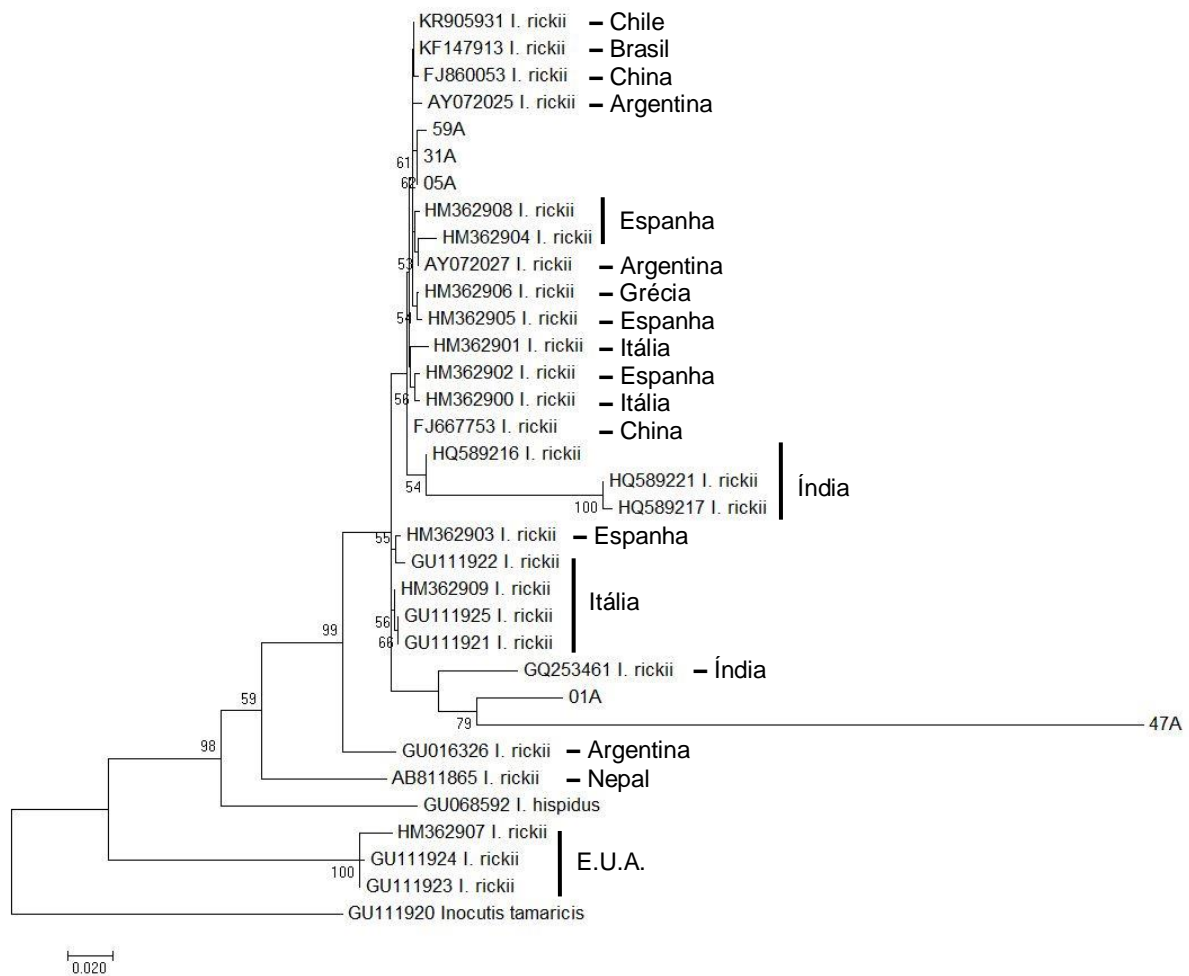
### 3.4.1. Sequenciação das regiões ITS e LSU do DNA ribossomal dos isolados de *Inonotus rickii*

O confronto das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA obtidas para os isolados previamente identificados como *I. rickii* com a base de dados pública NCBI confirmou a identidade dos mesmos. Desta forma procedeu-se à análise filogenética incluindo diversas sequências referências de *I. rickii* depositadas em bases de dados públicas. Inclui-se ainda na análise uma sequência de *I. hispidus* e uma sequência de *Inocutis tamaricis* (esta última utilizada como “outgroup”). No Anexo 5 apresenta-se o alinhamento das 34 sequências nucleotídicas (total de 505 pb após eliminação de “gaps”).

Os resultados da análise filogenética (dendrograma da Fig. 20) mostram uma separação significativa entre dois grupos, um composto pelos isolados dos EUA e o outro grupo (98 %) composto pelos restantes isolados, incluindo os cinco isolados obtidos no âmbito do presente trabalho, oriundos de *C. australis*. Os isolados B005A, B031A e B059A constituem um sub-grupo suportado por 61 % de “bootstrap” ao passo que os isolados B001A e B047A constituem um sub-grupo à parte (79 %). À semelhança dos resultados alcançados por Simone et al. (2011) também os isolados portugueses agruparam com os isolados da Europa, Argentina e China, constituindo os isolados oriundos da Florida (EUA) um grupo claramente à parte. Por outro lado, *I. hispidus* constitui um sub-grupo em relação aos isolados europeus, argentinos e chineses.

Para a região LSU (dendrograma da Fig. 21) os resultados obtidos para o BLAST foram muito variados. Dos cinco isolados sequenciados, três foram reconhecidos como *I. andersonii* (B005A, B031A e B059A), um como *I. rodway* (B001A) e outro como

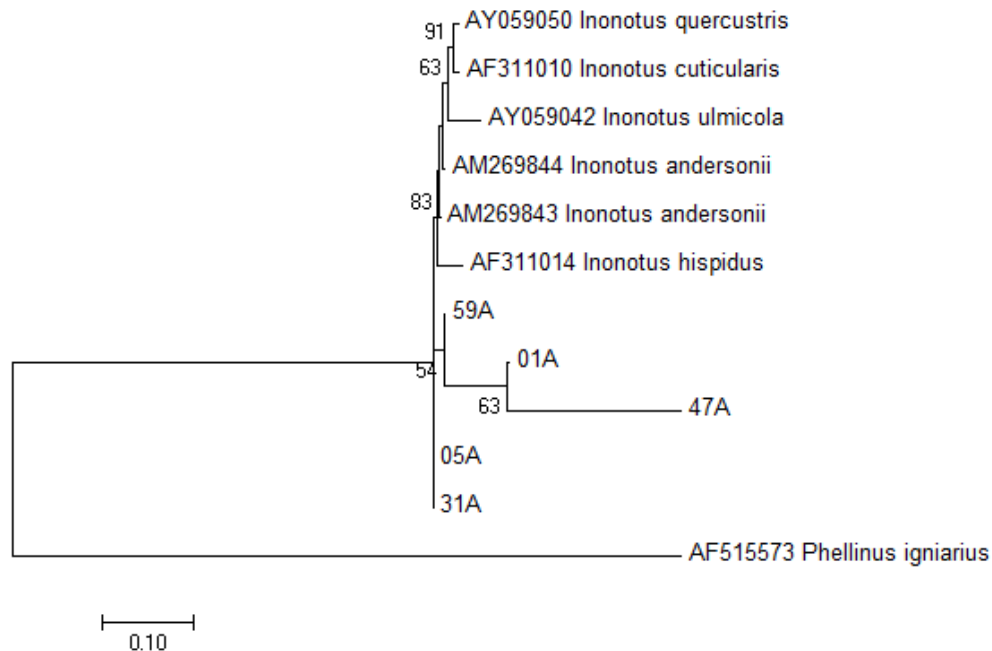
*I. quercustris* (B047A). Não existindo sequências de *I. rickii* para esta região na base de dados pública utilizaram-se outras espécies próximas para comparação; assim selecionaram-se sequências públicas das espécies referidas acima, um isolado de *I. cuticularis*, um de *I. ulmicola* e um de *I. hispidus*; *Phellinus igniarius* foi utilizado como “outgroup”. A análise filogenética indica uma clara separação em dois grupos: um com (74 %) compreendendo todos os isolados de espécies referência e os isolados B005A e B031A e outro suportado por 54 % de “bootstrap” que contém os isolados B001A, B047A e B059A.



**Figura 20.** Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região ITS do DNA ribossomal para isolados de *Inonotus rickii*, obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respetivo valor de “bootstrap” (valores superiores a 50 %); sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respetiva referência; a sequência de *Inocutis tamaricis* foi utilizada como “outgroup”.

Comparando a análise para a região LSU com a análise para a região do ITS do rDNA verifica-se que o isolado B059A passa a agrupar com os isolados B001A e B047A.

Segundo os resultados de Wagner & Fischer (2002) todas as espécies incluídas na análise pertencem ao grupo *Inonotus* s.s. Com efeito, também nesta análise estas espécies agrupam separadamente dos isolados de *I. rickii*.



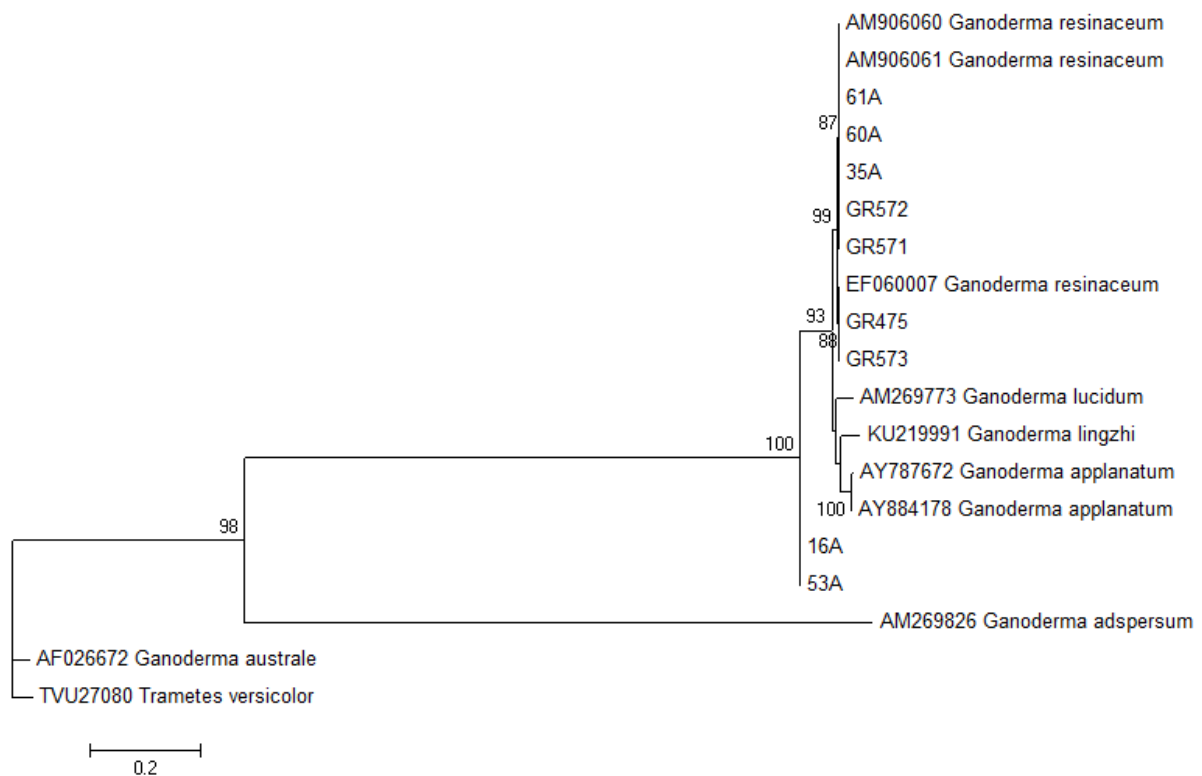
**Figura 21.** Dendrograma consenso resultante da análise das seqüências nucleotídicas da região LSU do DNA ribossomal para isolados de *Inonotus rickii*, obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respectivo valor de “bootstrap” (valores superiores a 50 %); seqüências obtidas de base de dados são identificadas com a respectiva referência; a seqüência de *Phellinus igniarius* foi utilizada como “outgroup”.

### 3.4.2. Sequenciação das regiões ITS e LSU do DNA ribossomal dos isolados de *Ganoderma* spp.

O confronto das seqüências nucleotídicas da região ITS do rDNA obtidas para os isolados previamente identificados dentro do género *Ganoderma* permitiu resultados próximos do esperado, face à identificação morfológica realizada anteriormente. A escolha dos isolados de referência foi baseada nos grupos discriminados por Moncalvo et al. (2000).

Para o género *Ganoderma* (dendrograma da Fig. 22) os resultados para a região ITS apontam para uma separação em dois grupos, um que contém apenas *G. australe*, e um segundo grupo suportado por 98 % de “bootstrap” englobando os restantes isolados. Neste segundo grupo o isolado de referência de *G. adspersum* encontra-se separado dos demais isolados. Formam-se depois vários sub-grupos sendo que os isolados identificados como *G. resinaceum* estão agregados (99 %) conjuntamente com os isolados referência da

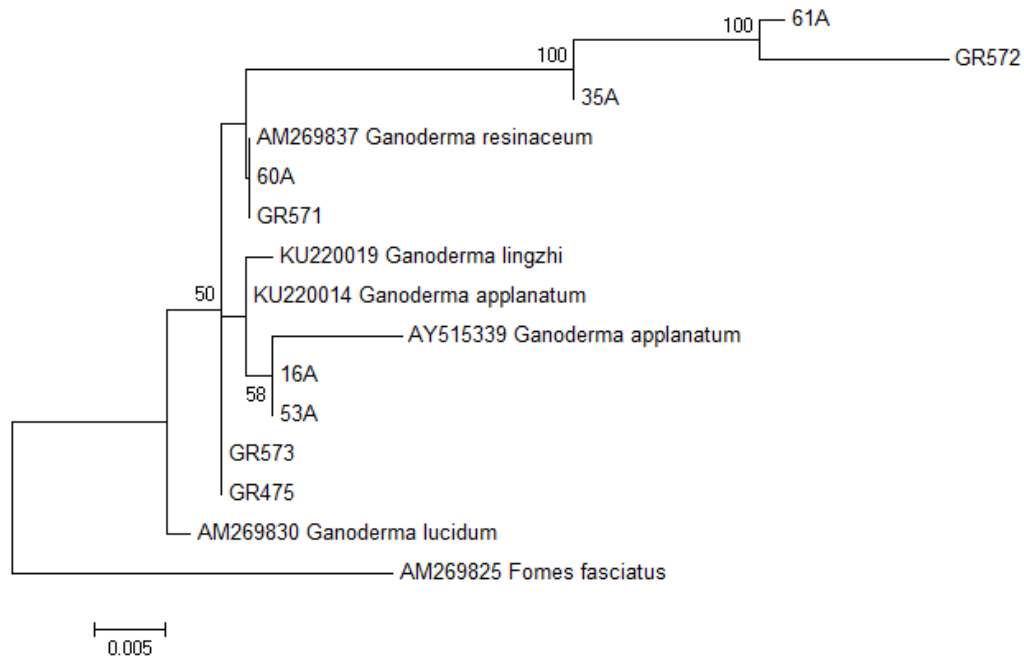
espécie. De sublinhar ainda que os isolados GR475 e GR573 obtidos a partir de *Quercus suber* constituem um grupo com o isolado de *G. resinaceum* de *Quercus rubra* oriundo da Alemanha (88 % “bootstraps” e com uma distância máxima de 0,00). Os isolados B016A e B053A constituem ainda um subgrupo (96 % de “bootstraps”) que dista dos isolados de *G. applanatum* cerca de 0,04, do isolado de *G. australe* cerca de 3,12 e de *G. adspersum* 3,94. Com efeito, para Seo & Kirk (2000) *G. australe* será sinónimo de *G. adspersum*, e, segundo Moncalvo et al. (2000), *G. applanatum* e *G. australe* constituem um grupo polifilético que necessita de ser melhor estudado.



**Figura 22.** Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região ITS do DNA ribossomal para isolados de *Ganoderma* spp., obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respetivo valor de “bootstrap” (valores superiores a 50 %); sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respetiva referência; a sequência de *Trametes versicolor* foi utilizada como “outgroup”.

Já para a região LSU os resultados obtidos na análise filogenética (dendrograma da Fig. 23) são consentâneos com os trabalhos de Seo & Kirk (2000) e Moncalvo et al. (2000). À exceção do isolado de *G. lucidum* todos os isolados constituem um grupo com 50 % de “bootstrap”. Alguns isolados foram identificados como *G. lingzhi* (B035A, B060A e B061A), denominação dada na China ao complexo *G. lucidum* (Seo & Kirk, 2000), complexo já proposto por Moncalvo et al. (2000). Apesar de estar no mesmo grupo, o complexo *G. applanatum* referido por este último autor também se encontra evidenciado, e contém os

isolados B016A, B053A, GR475 e GR573. O isolado B053A que se aproximou de *G. australe* e de *G. applanatum* na análise da região ITS agora revela também uma proximidade maior com *G. applanatum* (58 % “bootstraps” e com uma distância máxima de 0,00), o que mais uma vez está de acordo com Moncalvo et al. (2000).



**Figura 23.** Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região LSU do DNA ribossomal para isolados de *Ganoderma* spp., obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respectivo valor de “bootstrap”; sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respectiva referência; a sequência de *Fomes fasciatus* foi utilizada como “outgroup”.

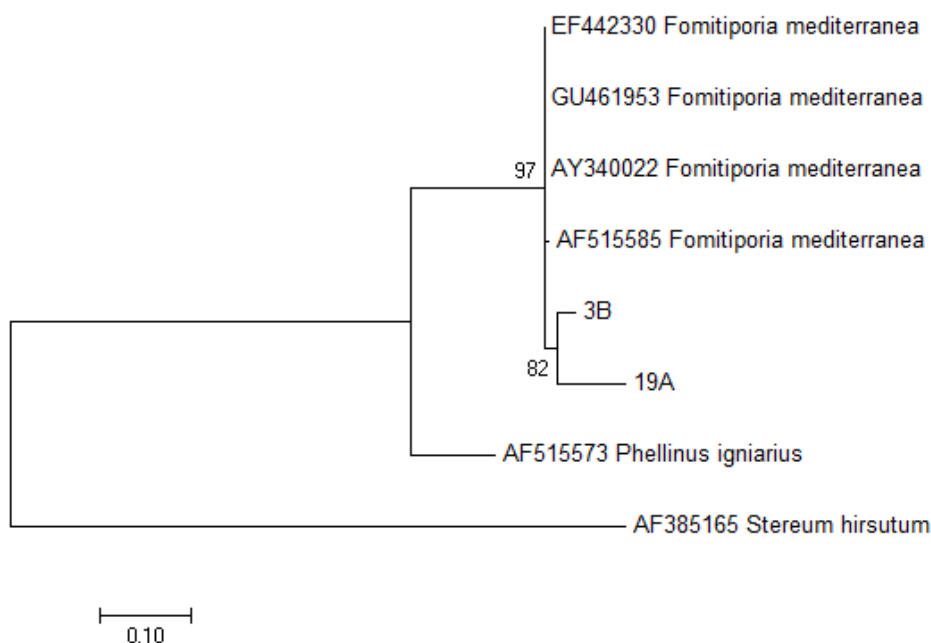
### 3.4.3. Sequenciação das regiões ITS e LSU do DNA ribossomal dos isolados de *Phellinus* spp.

Após o confronto das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA obtidas para os isolados previamente identificados dentro do género *Phellinus*, chegou-se à conclusão que os dois isolados B003B e B019A são *Fomitiporia mediterranea*. Foi feita uma comparação com alguns isolados desta mesma espécie, juntamente com um isolado de *P. igniarius* e um isolado de *Stereum hirsutum* (usado como “outgroup”) (Fig. 24).

Atualmente, e depois de muito debate, passou a considerar-se a existência de sinonímia entre o género *Phellinus* e o género *Fomitiporia* (Decock et al., 2005). Desta forma, segundo Fischer (2002; 2006), o complexo *F. mediterranea*/*F. pseudopunctata* (A. David, Dequatre & Fiasson) Fiasson é muito semelhante a *F. punctata* (sin. *P. punctatus*)

mas devem ser tratadas como espécies distintas, isto é, aquele autor separa o complexo *F. mediterranea*/*F. pseudopunctata* de *F. punctata* s.s..

No dendrograma resultante o isolado de *P. igniarus* está distante dos restantes isolados incluídos na análise e que constituem um grupo. Neste grupo suportado por 97 % de “bootstraps” os isolados B003B (de buxo) e B019A (de pitósporo) distam entre si 0,10 e de *F. mediterranea* entre 0,03 e 0,09, respetivamente. Os isolados referência de *F. mediterranea* incluídos na análise foram todos oriundos de videira. Aliás, em Portugal até à data *F. mediterranea* encontra-se referido apenas em videira, associado ao complexo de doenças da esca (Fischer, 2006).

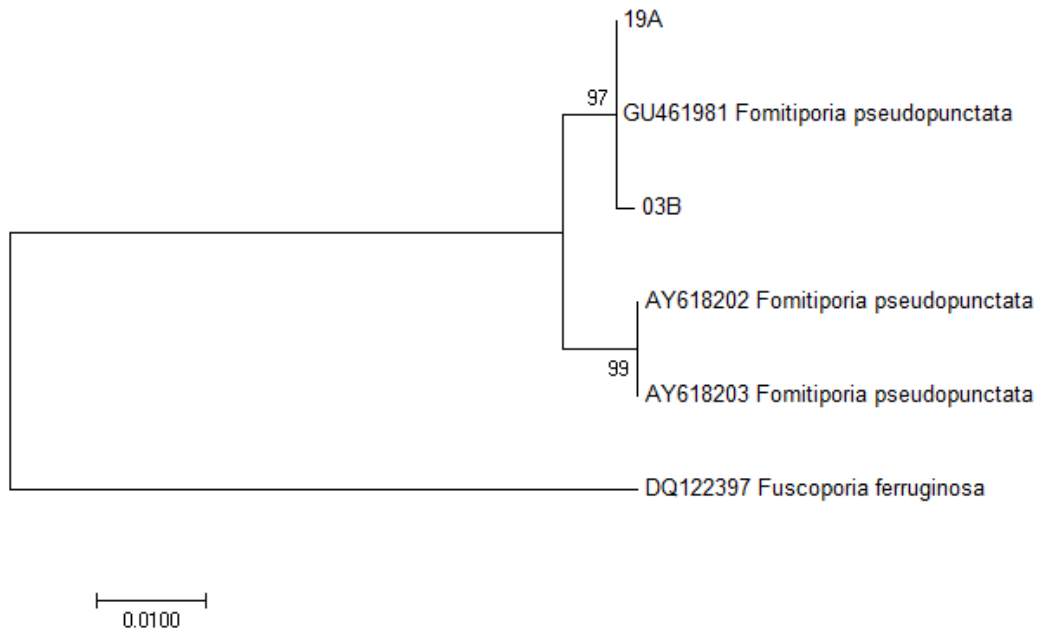


**Figura 24.** Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região ITS do DNA ribossomal para isolados de *Phellinus* spp., obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respetivo valor de “bootstrap”; sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respetiva referência; a sequência de *Stereum hirsutum* foi utilizada como “outgroup”.

Para a análise da região LSU os isolados de referência utilizados encontram-se depositados na base de dados pública como *F. pseudopunctata* (sin. *Phellinus pseudopuntatus* A. David, Dequatre & Fiasson). A partir da análise filogenética (dendrograma da Fig. 25) podemos observar um agrupamento a 97% de “bootstrap” e distância máxima de 0,00 dos isolados descritos no âmbito deste trabalho com um outro, neste caso oriundo da República Checa.

Os trabalhos de Decock et al. (2007) corroboram a separação das espécies *F. mediterranea*/*F. pseudopunctata* e *F. punctata* s.s. já apontada por Fischer (2002) e indicam mesmo que o fator geográfico pode ser relevante na separação destes dois taxa:

enquanto *F. punctata* s.s. é dominante no centro e norte da Europa, o complexo *F. mediterranea*/*F. pseudopunctata* está presente sobretudo mais a sul, em países de clima mais temperado nomeadamente na orla mediterrânica.



**Figura 25.** Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região LSU do DNA ribossomal para isolados de *Phellinus* spp., obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respetivo valor de “bootstrap”; sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respetiva referência; a sequência de *Fuscoporia ferruginosa* foi utilizada como “outgroup”.

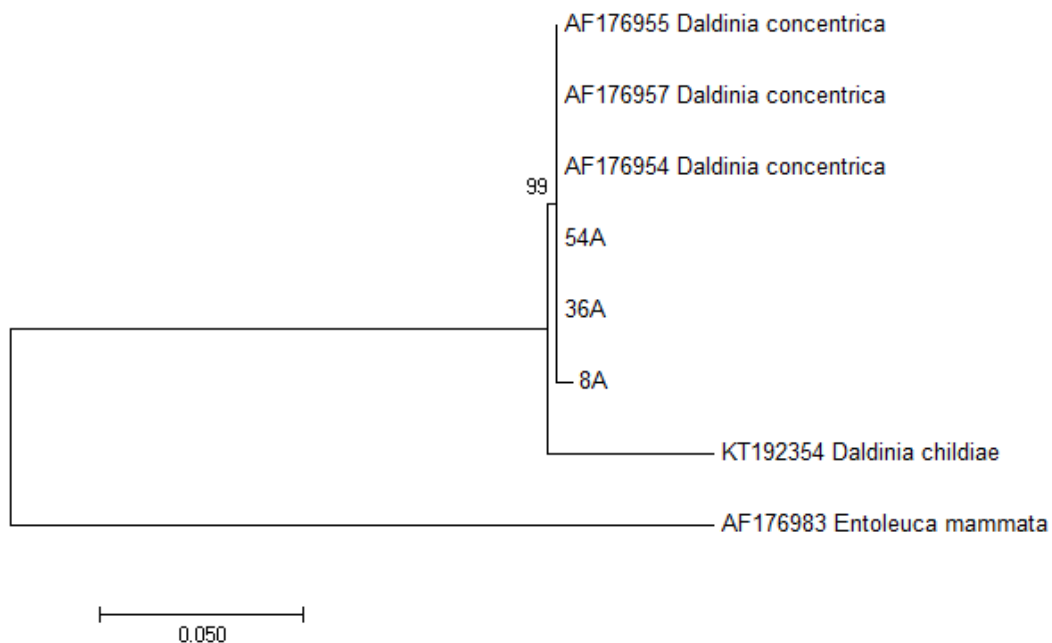
#### 3.4.4. Sequenciação das regiões ITS e LSU do DNA ribossomal dos isolados de *Daldinia* spp.

O confronto das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA obtidas para os isolados previamente identificados como *Daldinia concentrica* com a base de dados pública NCBI confirmou a identidade dos mesmos.

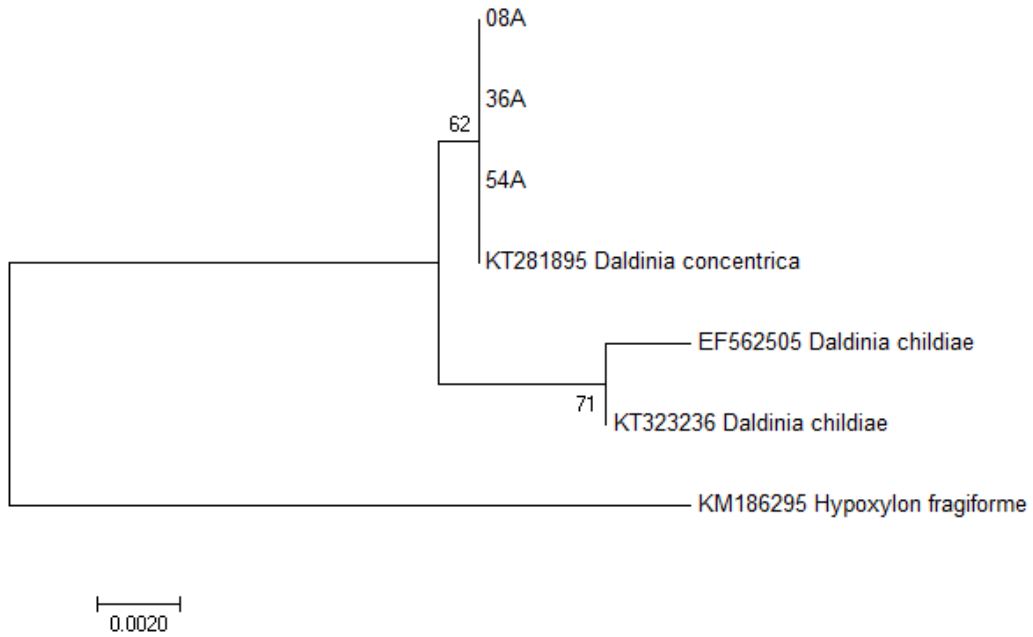
Segundo Stadler et al. (2014) existe uma diferença na denominação dos espécimes identificados como *D. concentrica* s.l., sendo que os europeus são considerados *D. concentrica* e os não europeus são reportados como *D. childiae*. Desta forma houve necessidade de comparar os resultados obtidos com um isolado com origem na China. Segundo Stadler et al. (2014) *D. concentrica* e *D. childiae* devem ser considerados grupos distintos e os resultados obtidos com a análise filogenética (dendrograma da Fig. 26) confirmam isso mesmo. Existe um grupo claro de *D. concentrica* com 99 % de “bootstrap”.

De referir que, Martínez-Álvarez et al. (2016) com base na análise filogenética de sequências nucleotídicas da região LSU e do ITS do rDNA reportaram a presença de *D. childiae* em Espanha em pinheiro.

A identificação com base nas sequências da região LSU do rDNA dos isolados angariados para este trabalho resultou na espécie *D. childiae*, e os resultados obtidos na análise filogenética (dendrograma da Fig. 27) mostram que estes ficam agrupados com um isolado de *D. concentrica* europeu (Alemanha), com 62 % de “bootstrap” (distância máxima de 0,00).



**Figura 26.** Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região ITS do DNA ribossomal para isolados de *Daldinia concentrica*, obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respetivo valor de “bootstrap”; sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respetiva referência; a sequência de *Entoleuca mammata* foi utilizada como “outgroup”.



**Figura 27.** Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região LSU do DNA ribossomal para isolados de *Daldinia concentrica*, obtido através do agrupamento por “Maximum Likelihood method”; foram utilizadas 1000 “bootstraps” e matrizes de distância de acordo com o modelo Kimura-2P; em cada nó os valores apresentados representam o respectivo valor de “bootstrap”; sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respectiva referência; a sequência de *Hypoxylon fragiforme* foi utilizada como “outgroup”.

#### 4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

As árvores desempenham um papel fulcral na construção dos aglomerados urbanos, contribuindo para a qualidade de vida dos cidadãos nos mais variados aspetos da sua vida quotidiana. Vivem porém num ambiente que lhes é hostil e frequentemente são afetadas por fungos basidiomicetas lenhícolas que causam podridões do lenho, afetando irreversivelmente a sua estabilidade mecânica.

Apesar dos progressos registados nos últimos anos no que respeita ao conhecimento sobre os fungos basidiomicetas lenhícolas, a informação disponível acerca da sua identificação, posicionamento taxonómico, distribuição geográfica e estratégias de colonização, encontra-se ainda dispersa. A utilização de técnicas de caracterização molecular como complemento às clássicas técnicas de caracterização morfológica, tem permitido esclarecer a identidade de diversos fungos habitualmente descritos como agentes causais de podridão em árvores na cidade, criando oportunidades para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico que contribuam para uma melhor gestão dos problemas das árvores. Em Portugal o conhecimento acerca destes fungos é ainda escassa e com o presente trabalho pretendeu-se contribuir para um melhor conhecimento da taxonomia e variabilidade dos agentes causais de podridões do lenho, em algumas espécies de árvores utilizadas em espaços verdes na região de Lisboa.

Analisando todos os resultados adquiridos ao longo do trabalho são de ressaltar os seguintes aspetos:

- a) Segundo a amostragem realizada, a espécie *Inonotus rickii* é frequente em Lisboa, afetando uma das espécies lenhosas mais utilizadas nos espaços verdes da cidade, o lodão-bastardo. Os fungos do género *Ganoderma* são também frequentemente encontrados, não só em lodão-bastardo mas também em plátano e em tília.
- b) A identificação dos fungos basidiomicetas com base na morfologia dos basidiomas é possível para algumas das espécies mais frequentes em árvores urbanas. Contudo, dado o carácter polifilético de algumas dessas espécies, o recurso à identificação molecular pode ser necessário, sobretudo se for indispensável conhecer o agente causal da podridão do lenho para a tomada de decisão na gestão do arvoredo.
- c) A obtenção de culturas puras destes fungos nem sempre se revelou fácil, quer pelo avançado estado de degradação dos basidiomas colhidos quer pela dificuldade em purificar as culturas contaminadas por outros fungos e bactérias.
- d) Para além de fungos basidiomicetas, no presente trabalho obtiveram-se ainda diversas culturas de fungos pertencentes a Ascomycota e a Zygomycota. A sequenciação da região ITS do rDNA de alguns desses fungos revelou a presença de *Fusarium* spp.,

*Phoma* spp. e *Epicoccum* spp., associados sobretudo a basidiomas já envelhecidos e muito degradados. Dentro dos fungos Ascomycota estudaram-se ainda isolados de *Daldinia concentrica*, espécie também associada a podridão do lenho.

- e) As coleções de isolados de *I. rickii* e *Ganoderma* spp. estudadas no âmbito deste trabalho mostram que existe variabilidade intraespecífica, nomeadamente em termos de características culturais, morfológicas e moleculares, revelando interesse em que o seu estudo em Portugal seja aprofundado.
- f) A análise filogenética das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA confirmou a identificação morfológica dos isolados de *I. rickii*. Apesar do caráter polifilético da maioria das espécies de *Ganoderma*, foi possível confirmar a existência na coleção de isolados de *G. australe* e de *G. resinaceum*. Entre os isolados previamente identificados como *Phellinus* spp., confirmou-se a presença de isolados pertencentes ao complexo *F. mediterranea*/*F. pseudopunctata*.
- g) Apesar da escassa disponibilidade das bases de dados públicas em sequências nucleotídicas para a região LSU do rDNA, a análise filogenética realizada permitiu de uma forma geral, confirmar os resultados obtidos para a análise da região ITS do rDN.

Sendo os fungos lenhícolas organismos importantes a ter em conta aquando da gestão de zonas urbanas, há todo o interesse em prosseguir o seu estudo. Assim perspetiva-se:

- 1) Dar continuidade à recolha e identificação destes fungos, mas agora com o intuito de formar uma coleção referente a todo o território português.
- 2) Recorrer a outro tipo de marcadores moleculares de forma a estudar melhor a variabilidade genética de *I. rickii* e *Ganoderma* spp.
- 3) Continuar o estudo da espécie *I. rickii*, nomeadamente efetuar testes de compatibilidade somática, de modo a entender o papel da reprodução sexuada e assexuada na disseminação da doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5<sup>th</sup> Edition. Academic Press, Inc. San Diego. USA. Pp. 266-274, 450-455.
- Amalfi, M., Decock, C., Yombiyeni, P. 2010. Fomitiporia in sub-Saharan Africa: Morphology and multigene phylogenetic analysis support three new species from the Guineo-Congolian rainforest. *Mycologia*, 102(6). Pp. 1303-1317.
- Annesi, T., D'Amica, L., Bressanin, D., Motta, E., Mazza, G. 2010. Characterization of Italian isolates of *Inonotus rickii*. *Phytopathologia Mediterranea*, 49. Pp. 301-308.
- Bahnweg, G., Schulze, S., Moller, EM., Rosenbrock, H., Langebartels, C., Sandermann, H. 1998. DNA isolation from recalcitrant materials such as tree roots, bark, and forest soil for the detection of fungal pathogens by polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 262. Pp. 79–82.
- Bang, T.H., Suhara, H., Doi, K., Ishikawa, H., Fukami, K., Parajuli, G.P., Katakura, Y., Shuntaro Yamashita, S., Watanabe, K., Adhikari, M.K., Manandhar, H. K., Kondo, R., Shimizu, K. 2014. Wild Mushrooms in Nepal: Some Potential Candidates as Antioxidant and ACE-Inhibition Sources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Pp. 1-12.
- Barnard, E.L. 1993. *Inonotus rickii* (anamorph: *Ptycogaster cubensis*): A wood-decaying fungus of importance to Florida hardwoods. *Plant Pathology Circular*, 357.
- Batt, C.A., Tortorello, M.-T, 2014 *Encyclopedia of Food Microbiology; Capítulo Classification of the Basidiomycota*. 2<sup>nd</sup> Edition. Pp. 21-23.
- Boyce, J.S.1948. *Forest Pathology*. 2<sup>nd</sup> Edition. American Forestry Series. McGraw-Hill Book Company, Inc.
- Breitenbach, J., Kränzlin, F. 1986. *Champignons de Suisse. Tome II Champignons Sans Lames*. Mycologia. Switzerland. Pp. 412.
- Brown, S.P., Rigdon-Huss, A.R., Jumpponen, A. 2014. Analyses of ITS and LSU gene regions provide congruent results on fungal community responses. *Fungal Ecology*, 9. Pp. 65-68.
- Bu, F., Yu, Z. 2015. Health evaluation of ancient oriental arborvitae by their endophytic fungi diversity. *Forestry College* (unpublished); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT192354>. acedido em 09.09.2016
- Caetano, M.F. 1995. Situações preocupantes das árvores em jardins e arruamentos de Portugal – Caso do coberto arbóreo da Praça do Campo Pequeno em Lisboa. *Vida Rural*. Pp. 22-24.
- Caetano, M.F., Ramos, A.P. 2009. Árvores na cidade: À descoberta de basidiomicetes. *Mundo das Plantas & Jardinagem*, 8. Pp. 48-50.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W. 2001. *The Fungi*. 2<sup>nd</sup> Edition. Academic Press, Inc. USA. Pp. 14, 64-65.
- Chang, T.T., Fu, C.S. 1998. Studies on eight species of polypores from Taiwan. *Fungi Science*, 13. Pp. 75-83.
- Clausen, C.A. 2003. Detecting decay fungi with antibody-based tests and immunoassays. *Wood Deterioration and Preservation*, 845. Pp. 325–336.

- Clausen, C.A., Kartal, S.N. 2003. Accelerated detection of brown-rot decay: comparison of soil block test, chemical analysis, mechanical properties, and immunodetection. *Forest Products Journal*, 53. Pp. 90–94.
- Cox, S. 2011. *Urban Trees. A Practical Management Guide*. The Crowood Press Ltd. Ramsbury, Marlborough.
- Crous, P.W., Verskley, G.J.M., Groenewald, J.Z., Samson, R.A. 2009. *Fungal Biodiversity*. CBS Laboratory Manual Series.
- Cui, B.K., Zhao, C.L., Vlasák, J., Dai, Y.C. 2014. A preliminary report on decay and canker of *Acacia richii* caused by *Inonotus rickii* in China. *Forest Pathology*, 44. Pp. 82-84.
- Dai, Y.C., D'Amicob, L., Mottab, E., T. Annesi, T. 2010. First report of *Inonotus rickii* causing canker and decay on *Hevea brasiliensis* in China. *Plant Patology*. 59. Pp. 806.
- Daranagama, D.A., Camporesi, E., Liu, X., Chamyuang, S., Stadler, M., Hyde, K.D. 2014. *Anthostomella* and related genera. *School of Science* (unpublished); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KM186295>. acedido em 09.09.2016
- Decock, C., Bitew, A., Castillo, G. 2005. *Fomitiporia tenuis* and *Fomitiporia aethiopica* (Basidiomycetes, *Hymenochaetales*), two undescribed species from the Ethiopian highlands: taxonomy and phylogeny. *Mycologia*, 97(1). Pp. 121-129.
- Decock, C., Figueroa, S.H., Robledo, G., Castillo, G. 2007. *Fomitiporia punctata* (Basidiomycota, *Hymenochaetales*) and its presumed taxonomic synonyms in America: taxonomy and phylogeny of some species from tropical/subtropical areas. *Mycologia*, 99(5). Pp. 733-752.
- Elena, K., Fischer, M., Dimou, D., Dimou, D.M. 2006. *Fomitiporia mediterranea* infecting citrus trees in Greece. *Phytopathology Mediterranea*, 45. Pp. 35-39.
- Eil-Fallal, A.A., El-Sayed, A.K.A, El-Esseily, S.R. 2015. First record of two *Ganoderma* species from North East Nile Delta-Egypt. *Mycosphere*, 6(3). Pp. 248-259.
- Fischer, M. 2002. A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress*, 1(3). Pp. 315-324.
- Fischer, M. 2006. Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathology Mediterranea*, 45. Pp. S30-S42.
- Fischer, 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). Pp. 799-811.
- Garbelotto, M., Ratcliff, A., Bruns, T.D., Cobb, F.W., Otrosina, W.J. 1996. Use of taxon-specific competitive-priming PCR to study host specificity, hybridization, and intergroup gene flow in intersterility groups of *Heterobasidion annosum*. *Phytopathology*, 86. Pp. 543-551.
- Göller, K., Rudolph, D. 2003. The need for unequivocally defined reference fungi-genomic variation in two strains named as *Coniophora puteana*. *BAM Ebw. 15. Holzforschung*, 57. Pp. 456-458.
- Gonthier, P., Nicolotti, G. 2007. A field key to identify common wood decay fungal species on standing trees. *Arboriculture and Urban Forestry*, 33. Pp. 410-420.
- Gonthier, P., Nicolotti, G. 2013. *Infectious Forest Diseases*. *CAB International*. Oxford.

- Gottlieb, A.M., Wright, J.E., Moncalvo, J.-M. 2002. *Inonotus* s. l. in Argentina – morphology, cultural characters and molecular analyses. *Mycological Progress*, 1(3). Pp. 299-313.
- Grangeia, C. 2012. *Efeitos do trofismo de cogumelos silvestres comestíveis do Nordeste de Portugal no seu potencial nutricional e nutracêutico*. Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança. Escola Superior Agrária. Bragança. Portugal.
- Guglielmo, F. 2005 *A molecular approach for the detection and early identification of wood rotting fungi as useful tool in tree stability assessment*. Ph.D. Thesis in Microbial Biotechnology. University of Florence. Florence. Italy. 131 Pp.
- Guglielmo, F., Bergemann, S.E., Gonthier, P., Nicolotti, G., Garbelotto, M. 2007. A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees. *Journal of Applied Microbiology*, 103. Pp. 1490-1507.
- Guglielmo, F., Gonthier, P., Garbelotto, M., Nicolotti, G. 2008. A PCR-based method for the identification of important wood rotting fungal taxa within *Ganoderma*, *Inonotus* s.l. and *Phellinus* s.l. *FEMS Microbiology Letter*, 282. Pp. 228-237.
- Hall, B.G. 2013. Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Molecular Biology Evolution*. Oxford. USA.
- Hibbett, D.S., Donoghue, M.J. 1995. Progress toward a phylogenetic classification of the Polyporaceae through parsimony analysis of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*, 73. Pp. S853-S861
- Hibbett, D.S., Pine, E.M., Langer, E., Langer, G., Donoghue, M.J. 1997. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *PNAS*, 94. Pp. 12002-12006
- Horst, R.K. 2001. *Westcott's Plant Disease Handbook*. 6<sup>th</sup> Edition. Kluwer Academic Publishers. Pp. 41-42, 47-49, 347, 350, 370, 396, 403-404.
- ICNF–Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. 2013. Programa Operacional de Sanidade Florestal. Disponível em: <http://www.icnf.pt/portal/florestas/pragdoe/resource/doc/posf/posf>. Acedido em: 09.09.2016
- Intini, M.G., 1990. *Funghi caratteristiche e ambienti di vita di macromiceti lignicoli delle zone temperate e tropicali*. Natura e ambiente. Edizioni IT-COMM.-Firenze. Pp. 42, 128, 132, 138, 150, 168.
- Intini, M. 2002. First report of *Inonotus rickii* causing canker rot on boxelder in Europe. *Plant Disease*, 86. Pp. 922.
- Intini, M., Tello, M.L. 2003. Investigaciones sobre hongos xilófagos de árboles urbanos en Europa: primera cita de *Inonotus rickii* (Pa.) Reid en España. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 29. Pp. 277-279.
- Jasalavich, C.A., Ostrofsky, A., Jellison, J. 2000. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 66. Pp.4725-4734.
- Jellison, J., Goodell, B. 1989. Inhibitory effects of undecayed wood and the detection of *Postia placenta* using the enzyme-linked immunosorbent assay. *Wood, Science and Technology*, 23. Pp. 13-20.

- Jellison, J., Jasalavich, C. 2000. A review of selected methods for the detection of degradative fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46. Pp. 241-244.
- Jeong, W.J., Lim, Y.W., Lee, J.S., Jung, H.S. 2005. Phylogeny of *Phellinus* and related genera inferred from ITS and mitochondrial SSU rDNA sequences. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(5). Pp. 1028-1038
- Johannesson, H., Læssøe, T., Stenlid, J. 2000. Molecular and morphological investigation of *Daldinia* in northern Europe. *Mycological Research*, 104(3). Pp.275-280.
- Kapoor, P., Sharma, B.M. 2014. Studies on different growth parameters of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 3(4). Pp. 1515-1524.
- Kim, K.M., Yoon, Y., Jung, H.S. 2005. Evaluation of the monophyly of *Fomitopsis* using parsimony and MCMC methods. *Mycologia*, 97(4). Pp. 812-822.
- Konijnendijk, C.C., Randrup, T.B., Nilsson, K. 2000. Urban forestry research in Europe: An overview. *Journal of Arboriculture*, 26(3). Pp.152-161.
- Kuchelmeister, G. 2000. Trees for the urban millennium: Urban forestry update. *Unasylva* 200, 51. Pp. 49-55.
- Lim, Y.W., Yeung, Y.C.A., Sturrock, R., Leal, I., Breuil, C. 2005. Differentiating the two closely related species, *Phellinus weirii* and *P. sulphurascens*. *Forest Pathology*, 35. Pp. 305-314
- Lonsdale, D. 1999. *Principles of Tree Hazard Assessment and Management*. Forestry Commission. London. UK. Pp. 388.
- Lucas, G.B., Campbell, C.L., Lucas, L.T. 1985. *Introduction to Plant Diseases – identification and management*. Department of Plant Pathology. The AVI Publishing Company. North Carolina. USA. Pp. 141-143.
- Lucas, J.A. 1998. *Plant Pathology and Plant Pathogens*. 3<sup>rd</sup> Edition. Blackwell Science Ltd. Pp. 30-33, 47-49.
- Martínez-Álvarez, P., Fernández-González, R.A., Sanz-Ros, A.V., Pando, V., Diez, J.J. 2016. Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. *Biological Control*, 94. Pp. 1-10.
- Mattheck, C., Breloer, H. 1994. Field guide for visual tree assessment (VTA). *Arboriculture Journal*, 18. Pp. 1-23.
- Melo, I., Ramos, A.P., Caetano, M.F. 2002. First recording of *Inonotus rickii* (basidiomycetes, hymenochaetaceae) in Portugal. *Portugaliae Acta Biologica*, 20. Pp. 265-269.
- Miller, A.N., Vasilyeva, L.N., Rogers, J.D. 2007. *Chlorostroma subcubisporum* gen. et sp. nov. and notes on the systematic position of *Thuemenella cubispora*. *Sydowia*, 59. Pp. 138-146.
- Moncalvo, J.-M., Lutzoni, F., Rehner, S.A., Johnson, J., Vilgalys, R. 2000. Phylogenetic Relationships of Agaric Fungi Based on Nuclear Large Subunit Ribosomal DNA Sequences. *Systematic Biology*, 49. Pp. 278-305.
- Nagadesi, P.K., Arya, A. 2014. Delignification of Valuable Timbers decayed by India Lignicolous fungi, *International Letters of Natural Sciences*, 11(2). Pp. 101-102

- Nicolotti, G., Gonthier, P., Guglielmo, F., Garbelotto, M.M. 2010. Advances in Detection and Identification of Wood Rotting Fungi in Timber and Standing Trees *In* Gherbawy, Y., Kerstin Voigt, K. 2010. *Molecular Identification of fungi*. Springer, 35(1). Berlin. Pp.14-19.
- Nilsson, R.H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., Kristiansson, E. 2009. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *Research Letter*. Pp. 97-101.
- Nobles, M.K. 1948. Studies in forest pathology: VI – Identification of cultures of wood-rotting fungi. *Canadian Journal of Research*, 26. Pp. 281-431.
- Otrosina, W.J., Chase, T.E., Cobb, F.W.Jr. 1992 Allozyme differentiation of intersterility groups of *Heterobasidion annosum* isolated from conifers in the western United States. *Phytopathology*, 82. Pp. 54-545.
- Passola, G. 2011. *Hongos Xilófagos que Viven en lo Árboles*. Editorial Círculo Rojo – Investigación. Espanha. Pp. 46-51.
- Pegg, G.F., Ayres, P.G. 1987. *Fungal Infection of plants*. British Mycological Society. Cambridge. UK. Pp. 133-152
- Priestley, R., Mohammed, C., Dewey, F.M. 1994. The development of monoclonal antibody-based ELISA and dipstick assays for the detection and identification of *Armillaria* species in infected wood *In* Schots, A., Dewey, F.M., Oliver, R.P. 1994. Modern assays for plant pathogenic fungi. *CAB International*. Oxford. USA. Pp. 149-156.
- Ramos, A.P. 2009. Colletotrichum diseases of citrus in Portugal: key pathogens, inter- and intra-species diversity and cross-infection potential. Tese de Doutoramento em Engenharia Agronómica, Universidade de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Ramos, A.P., Caetano, M.F., Melo, I. 2008. *Inonotus rickii* (Pat.) Reid: Um importante basidiomiceta lenhícola em árvores urbanas. *Revista Ciências Agrárias*, 31. Pp. 159-167.
- Ramos, A.P., Lima, A., Melo, I., Caetano, M.F. 2011. As árvores monumentais e os problemas fitossanitários *In* Libro de ponencias, El árbol histórico herencia cultural. I Congreso Hispano-Luso de Arboricultura / XIV Congreso Nacional de Arboricultura.
- Ramos, A.P., Maia, F., Valada, T., Ferreira, B., Soares, P., Caetano, M. F. 2016. Risk assessment of *Celtis australis* affected by *Inonotus rickii* in Lisbon town. 6th International Conference of Landscape & Urban Horticulture. Greece
- Robles, C.A., Carmarán, C.C., Lopez, S.E. 2012. Molecular techniques based on ITS analysis: useful tools for the identification of Wood-decay Basidiomycetes in urban trees?. *Kurtziana*, 37(1). Pp. 91-108.
- Ryvarden, L., Gilbertson, R.L. 1993-1994. *European Polypores*. Fungiflora, 1-2. Norway. Oslo.
- Saccardo, P.A. 1891. *Chromotaxia seu nomenclator colorum polyglotus adctilis specimenibus coloratis ad botanicorum et zoologorum*. Patavii. Italie.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York. USA.
- Schmidt, O., Moreth, U. 1995. Detection and differentiation of *Poria* indoor brown-rot fungi by polyacrylamide gel electrophoresis. *Holzforschung*, 49. Pp.11-14.

- Schmidt, O., Gaiser, O., Dujesiefken, D. 2011. Molecular identification of decay fungi in the wood of urban trees. *European Journal of Forest Research*. Pp. 885-891.
- Schwarze, F.W.M.R., Engels, J., Mattheck, C. 2000. *Fungal Strategies of Wood Decay in Trees*. Springer.
- Schwarze, F.W.M.R., Ferner, D. 2003. Ganoderma on trees – Differentiation of species and studies of invasiveness. *Arboricultural Journal: The International Journal of Urban Forestry*, 27(1). Pp. 59-77.
- Seo, G.S., Kirk, P.M. 2000. *Ganodermataceae: Nomenclature and Classification*. In Flood, J., Bridge, P.D., Holderness, M. 2000. *Ganoderma diseases of Perennial Crops*. CABInternacional Publishing. UK. 275 Pp.
- Sepulveda-Chavera, G., Huanca-Mamani, W., Cardenas-Ninasivincha, S., Salinas, F., Belmonte, E., Torres, T., Latorre, B. 2015. First Report of *Inonotus rickii* causing decay and death in Californian pepper tree (*Schinus molle*) in northern Chile. *Produccion Agricola* (unpublished); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR905931> acedido em 09.09.2016
- Shigo, A.L. 1989. *A New Tree Biology – Facts, photos and philosophies on trees and their problems and proper care*. Shigo and Trees, Associates. USA.
- Shoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., and the Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as universal DNA barcode marker for fungi. *PNAS*, 109. Pp. 6241-6246.
- Sicoli, G., Fatehi, J., Stenlid, J. 2003. Development of species-specific PCR primers on rDNA for the identification of European *Armillaria* species. *Forest Pathology*, 33. Pp. 287-297.
- Simone, D., D'Amico, L., Bressanin, D., Motta, E., Annesi, T. 2011. Molecular characterization of *Inonotus rickii*/*Ptychogaster cubensis* isolates from different geographic provenances. *Mycological Progress*, 10. Pp. 301-306.
- Singh, S.K., Pathak, R. and Raturi, A. 2010. Molecular characterization of wild mushrooms of Rajasthan. Unpublished.
- Singh, A.P., Singh, T. 2014. Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. *Biomass and Bioenergy*, 62. Pp.198-206.
- Smith, B.J., Sivasithamparam, K. (2000) Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of five species of *Ganoderma* from Australia. *Mycological Research*, 104(8). Pp. 943–951.
- Sonnenberg, R., Arne W Nolte, A.W., Tautz, D. 2007. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers in Zoology*, 4(6).
- Song, J., Xing, J.H., Cui, B.K. 2015. Phylogeny and taxonomy of *Amauroderma* (Polyporales) with descriptions of one new species from southern China. *Institute of Microbiology* (unpublished); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU220014> acedido em 09.09.2016
- Stadler, M., Læssøe, T., Jacques, F., Decock, C., Schmieschek, B., Tichy, H.-V., Peršoh, D. 2014. A polyphasic taxonomy of *Daldinia* (Xylariaceae). *Studies in Mycology* 77. Pp. 1-143.
- Stalpers, J.A. 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllphorales in pure culture. *Studia Mycologica*, 16. Pp. 1-248.
- Svrček, M. 2000. *A field guide in colour to Mushrooms*. Silverdal Books. Pp. 74, 76, 170, 172.

- Tavares, M.F. 2011. Aulas cedidas na cadeia de Tecnologias da Madeira de Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. Portugal.
- Terho, M., Hallaksella, A.M. 2005. Potential hazard characteristics of Tilia, Betula and Acer trees removed in the Helsinki City Area during 2001–2003. *Urban Forestry & Urban Greening*, 3. Pp. 113-120.
- Terho, M., Hantula, J., Hallaksela, A.-M. 2007. Occurrence and decay patterns of common wood-decay fungi in hazardous trees felled in the Helsinki City. *Forest Pathology*, 37. Pp. 420-432.
- Tomšovský, M., Kolářík, M., Paňoutová, S. 2006. Ladislav Homolka Molecular phylogeny of European *Trametes* (Basidiomycetes, Polyporales) species based on LSU and ITS (nrDNA) sequences. *Nova Hedwigia*, 82. Pp. 269-280.
- Utomo, C., Niepold, F. 2000. Development of diagnostic methods for detecting *Ganoderma* infected oil palms. *Journal of Phytopathology*, 148. Pp. 507-514.
- van Halder, I. (Coord.). 2002. *Pragas e doenças das florestas do Sul da Europa*. IEFEC – Institut Européen de la Forêt Cultivée. Cestas. França.
- 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. *Mycologia*, 94(6). Pp. 998-1016.
- Wahlstrom, K., Karlsson, J.O., Holdenrieder, O., Stenlid, J. 1991. Pectinolytic activity and isozymes in European *Armillaria* species. *Canadian Journal of Botany*, 69. Pp. 2732-2739.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Eds. Innis, M.A., Gelfand, D., Sninsky, J.J., White, T.J. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc. San Diego. USA. Pp. 315-322.
- Wilcox, W.W. 1978. Review of literature on the effects of early stages of decay on wood strength. *Wood and Fiber*, 9(4). Pp. 252-257.
- Wood, R.K.S., Jellis, G.J. 1984. *Plant Diseases – Infection, Damage and Loss*. British Society for Plant Pathology. Blackwell Scientific Publications.
- Worrall, J.J., Anagnost, S.E., Zabel, R.A. 1997. Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi, *Mycologia*, Pp. 199-219.

## ANEXOS

### Anexo 1

#### Protocolo de extração de DNA

QIAGEN® Protocol - Isolation of Total DNA from Plant Tissue Using the DNeasy Plant Mini Kit  
(adaptado de QIAGEN 2004. *DNeasy Plant Mini and DNeasy Plant Maxi Handbook 01/2004*.

QIAGEN, Hilden, Germany)

#### Reagents and materials provided with the Kit

- Buffer AP1
- Buffer AP2
- Buffer AP3
- Buffer AW
- Buffer AE
- RNase A (100 mg.ml<sup>-1</sup>)
- DNeasy Spin Columns
- QIAshredder™ Mini Spin Columns
- Collection Tubes (2 ml)

#### Equipment required but not provided

- Microcentrifuge tubes (1.5 ml)
- Microcentrifuge with rotor for 2 ml tubes

1. Add 400 µl of Buffer AP1 and 4 µl of RNase A stock solution (100 mg/ml) to a maximum of 20 mg (dried) fungal tissue and vortex vigorously.

No tissue clumps should be visible. Vortex or pipet further to remove any clumps. Clumped tissue will not lyse properly and will therefore result in a lower yield of DNA. In the rare case where clumps cannot be removed by pipetting and vortexing, a disposable micropestle may be used.

2. Incubate the mixture for 10 min at 65°C. Mix 2–3 times during incubation by inverting tube. This step lyses the cells.

3. Add 130 µl of Buffer AP2 to the lysate, mix, and incubate for 5 min on ice. This step precipitates detergent, proteins, and polysaccharides. Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).

4. Apply the lysate to the QIAshredder Mini Spin Column (lilac) placed in a 2 ml collection tube and centrifuge for 2 min at 20,000 x *g* (14,000 rpm). It may be necessary to cut the end of the pipet tip to apply the lysate to the QIAshredder Mini Column. The QIAshredder Mini Column removes most precipitates and cell debris, but a small amount will pass through and form a pellet in the collection tube. Be careful not to disturb this pellet in step 5.

5. Transfer flow-through fraction from step 4 to a new tube (not supplied) without disturbing the cell-debris pellet. Typically 450 µl of lysate is recovered. For some plant species less lysate is recovered. In this case determine volume for the next step.

6. Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E to the cleared lysate and mix by pipetting. It is important to pipet Buffer AP3/E directly onto the cleared lysate and to mix immediately.

7. Apply 650 µl of the mixture from step 6, including any precipitate which may have formed, to the DNeasy Mini Spin Column sitting in a 2 ml collection tube (supplied). Centrifuge for 1 min at ≥6000 x *g* (corresponds to ≥8000 rpm for most microcentrifuges) and discard flow-through. Reuse the collection tube in step 8.

8. Repeat step 7 with remaining sample. Discard flow-through\* and collection tube.

9. Place DNeasy Mini Spin Column in a new 2 ml collection tube (supplied), add 500 µl Buffer AW to the DNeasy Mini Spin Column and centrifuge for 1 min at ≥6000 x *g* (≥8000 rpm). Discard flow-through and reuse the collection tube in step 10.

10. Add 500 µl Buffer AW to the DNeasy Mini Spin Column and centrifuge for 2 min at 20,000 x *g* (14,000 rpm) to dry the membrane. It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini Spin Column since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This spin ensures that no residual ethanol will be carried over during elution. Discard flow-through and collection tube.

11. Transfer the DNeasy Mini Spin Column to a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not supplied) and pipet 100 µl of Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C) and then centrifuge for 1 min at ≥6000 x *g* (≥8000 rpm) to elute. Elution with 50 µl (instead of 100 µl) increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but also reduces overall DNA yield. If larger amounts of DNA (>20 µg) are loaded, eluting with 200 µl (instead of 100 µl) increases yield.

12. Repeat step 11 once. A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, the microcentrifuge tube can be reused for the second elution step to combine the eluates.

Note: All centrifugation steps were carried out at room temperature (15–25°C).

## Anexo 2

### Protocolo de purificação de DNA

QIAquick PCR Purification Kit Protocol (adaptado de QIAGEN 2002. *QIAquick® Spin Handbook, July/2004*. QIAGEN, Hilden, Germany)

This protocol is designed to purify single- or double-stranded DNA fragments from PCR and other enzymatic reactions (see page 8). For cleanup of other enzymatic reactions, follow the protocol as described for PCR samples or use the new MinElute Reaction Cleanup Kit. Fragments ranging from 100 bp to 10 kb are purified from primers, nucleotides, polymerases, and salts using QIAquick spin columns in a microcentrifuge.

Reagents and materials provided with the Kit

- Buffer PB
- Buffer PE
- Buffer EB
- QIAquick Spin Columns
- Collection Tubes (2 ml)

Equipment required but not provided

- Microcentrifuge tubes (1.5 ml)
- Microcentrifuge with rotor for 2 ml tubes

1. Transfer each PCR sample into a microcentrifuge tube (1.5 ml) and add buffer 0.1mM Tris pH 8.0 up to a final volume of 50  $\mu$ l.

2. Add 5 volumes of Buffer PB to 1 volume of the PCR sample and mix.

For example, add 500  $\mu$ l of Buffer PB to 100  $\mu$ l PCR sample .

3. Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.

4. To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column and centrifuge for 30–60 s, at 8,000-10,000 rpm.

5. Discard flow-through. Place the QIAquick column back into the same tube. Collection tubes are re-used to reduce plastic waste.

6. To wash, add 0.75 ml Buffer PE to the QIAquick column and centrifuge for 30–60 s, at 10,000 rpm.

7. Discard flow-through and place the QIAquick column back in a new tube (take the lid out). Centrifuge the column for an additional 1 min, at maximum speed. Let the column stand for 1 min.

8. Place QIAquick column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.

9. To elute DNA, add 50  $\mu$ l Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) or H<sub>2</sub>O to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1-2 min, and then centrifuge for 1 min at 10,000 rpm.

### Anexo 3

#### Medições do ensaio de crescimento. Tratamento estatístico.

**Quadro 3.1.** Valores de crescimento em diâmetro (mm) medidos ao 4º dia de ensaio de crescimento para cada um dos 11 isolados escolhidos

CODIGO ISOLADO	PDA						MEA					
	1		2		3		1		2		3	
B001A	11	11	12	11	11	12	2	4	6	9	4	8
B004B	23	21	24	21	24	25	24	23	26	24	23	24
B005A	15	16	14	13	14	14	11	12	14	14	13	14
B007A	49	48	47	47	46	46	42	42	42	42	43	43
B016A	17	18	17	19	19	17	22	24	22	24	22	22
B027B	32	34	32	32	33	33	36	37	35	37	34	34
B032B	11	12	14	13	14	15	11	11	12	13	12	12
B035A	43	41	43	42	42	42	41	40	40	41	41	43
B044A	11	11	11	11	12	12	12	12	10	10	10	10
B053A	12	12	15	13	15	15	18	20	19	21	19	20
B057A	26	28	22	22	25	24	20	20	27	27	29	27

**Quadro 3.2.** Valores de crescimento em diâmetro (mm) medidos ao 7º dia de ensaio de crescimento para cada um dos 11 isolados escolhidos

CODIGO ISOLADO	PDA						MEA					
	1		2		3		1		2		3	
B001A	31	32	34	32	31	31	20	18	18	17	16	16
B004B	31	29	32	31	31	34	41	40	41	40	40	41
B005A	35	36	36	35	38	38	35	37	37	38	44	44
B007A	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B016A	41	41	43	42	39	41	49	47	52	51	47	53
B027B	61	67	61	61	62	61	70	70	70	70	70	70
B032B	34	36	36	36	36	34	35	35	36	35	36	36
B035A	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B044A	38	40	37	36	36	35	37	37	36	35	34	34
B053A	25	24	29	25	26	24	47	49	48	50	48	46
B057A	63	62	57	58	61	61	57	57	60	60	62	62

**Quadro 3.3.** Valores de crescimento em diâmetro (mm) medidos ao 9º dia de ensaio de crescimento para cada um dos 11 isolados escolhidos

CODIGO ISOLADO	PDA						MEA					
	1		2		3		1		2		3	
B001A	49	49	51	48	48	47	26	27	30	28	27	26
B004B	38	37	38	39	40	42	52	51	53	50	53	53
B005A	58	54	52	52	59	57	48	48	52	52	47	48
B007A	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B016A	58	56	57	57	57	53	66	65	66	67	66	66
B027B	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B032B	52	54	51	55	52	53	52	51	54	54	46	54
B035A	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B044A	60	57	58	58	56	56	51	50	55	53	48	46
B053A	32	34	39	34	32	33	63	65	66	65	63	62
B057A	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70

**Quadro 3.4.** Valores de crescimento em diâmetro (mm) medidos ao 10º dia de ensaio de crescimento para cada um dos 11 isolados escolhidos

CODIGO ISOLADO	PDA						MEA					
	1		2		3		1		2		3	
B001A	55	55	53	56	55	52	29	30	32	31	31	30
B004B	42	41	43	43	46	42	60	57	59	58	58	59
B005A	62	64	60	59	66	62	48	50	59	62	51	51
B007A	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B016A	62	63	62	63	59	60	70	70	70	70	70	70
B027B	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B032B	59	61	58	62	60	61	55	55	61	62	49	48
B035A	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B044A	66	66	65	66	68	68	53	52	57	57	50	49
B053A	36	37	43	37	36	36	70	70	70	70	70	70
B057A	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70

**Quadro 3.5.** Resultados da análise de variância ANOVA a dois fatores (isolado e meio), efeitos fixos,  $\alpha=0,05$ , para a variável “diâmetro da colônia” (mm) em PDA e MEA, após 4 dias de crescimento à temperatura de 25°C

	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F</b>	<b>p-value</b>
<b>Isolado</b>	10	1856,39	807,66	0,00
<b>Meio</b>	1	0,01	0,00	0,95
<b>Interação</b>	10	38,82	16,89	0,00
<b>Erro</b>	110	2,30		

**Quadro 3.6.** Resultados da análise de variância ANOVA a dois fatores (isolado e meio), efeitos fixos,  $\alpha=0,05$ , para a variável “diâmetro da colônia” (mm) em PDA e MEA, após 7 dias de crescimento à temperatura de 25°C

	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F</b>	<b>p-value</b>
<b>Isolado</b>	10	3186,30	1167,00	0,00
<b>Meio</b>	1	327,80	120,00	0,00
<b>Interação</b>	10	250,10	91,60	0,00
<b>Erro</b>	110	2,70		

**Quadro 3.7.** Resultados da análise de variância ANOVA a dois fatores (isolado e meio), efeitos fixos,  $\alpha=0,05$ , para a variável “diâmetro da colônia” (mm) em PDA e MEA, após 9 dias de crescimento à temperatura de 25°C

	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F</b>	<b>p-value</b>
<b>Isolado</b>	10	1561,70	563,60	0,00
<b>Meio</b>	1	80,40	29,00	0,00
<b>Interação</b>	10	503,60	181,70	0,00
<b>Erro</b>	110	2,80		

**Quadro 3.8.** Resultados da análise de variância ANOVA a dois fatores (isolado e meio), efeitos fixos,  $\alpha=0,05$ , para a variável “diâmetro da colônia” (mm) em PDA e MEA, após 10 dias de crescimento à temperatura de 25°C

	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F</b>	<b>p-value</b>
<b>Isolado</b>	10	1048,30	219,70	0,00
<b>Meio</b>	1	8,20	1,70	0,19
<b>Interação</b>	10	667,00	139,80	0,00
<b>Erro</b>	110	4,80		

**Quadro 3.9.** Resultados da análise de variância ANOVA a um fatores (isolado), efeitos fixos,  $\alpha=0,05$ , para a variável “diâmetro da colônia” (mm) PDA, após 7 dias de crescimento à temperatura de 25°C

	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p-value
<b>Isolado</b>	10	1658,50	684,13	0,00
<b>Erro</b>	55	2,42		

**Quadro 3.10.** Resultados da análise de variância ANOVA a um fatores (isolado), efeitos fixos,  $\alpha=0,05$ , para a variável “diâmetro da colônia” (mm) MEA, após 7 dias de crescimento à temperatura de 25°C

	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p-value
<b>Isolado</b>	10	1777,89	585,53	0,00
<b>Erro</b>	55	3,04		

**Quadro 3.11.** Distribuição dos isolados de *Inonotus rickii* e *Ganoderma* spp. por grupos homogêneos de acordo com teste de comparação de médias (Tukey, 95% de confiança) realizado para o diâmetro das colônias (mm) em placas de Petri com PDA, após 7 dias de crescimento à temperatura de 25°C

Isolado	Meio	Média	Grupos Homogêneos <sup>(a)</sup>			
B001A	MEA	17,50	a			
B053A	PDA	25,50	b			
B004B	PDA	31,33	c			
B001A	PDA	31,83	c	d		
B032B	PDA	35,33		d	e	
B032B	MEA	35,50			e	
B044A	MEA	35,50			e	
B005A	PDA	36,33			e	f
B044A	PDA	37,00			e	f g
B005A	MEA	39,17			f	g h
B004B	MEA	40,50				g h
B016A	PDA	41,17				h
B053A	MEA	48,00				i
B016A	MEA	49,83				i
B057A	MEA	59,67				j
B057A	PDA	60,33				j
B027B	PDA	62,17				j
B007A	MEA	70,00				k
B007A	PDA	70,00				k
B027B	MEA	70,00				k
B035A	PDA	70,00				k
B035A	MEA	70,00				k

<sup>(a)</sup> Isolados com uma ou mais letras em comum não diferem significativamente para esta característica.

## Anexo 4

### Caraterização cultural e morfológica

**Quadro 4.1.** Caraterização cultural e morfológica dos 11 isolados escolhidos para o ensaio de crescimento, em meio PDA (RD, regular e difusa. IN, irregular e nítida. –, ausente. +, presente)

Código isolado	Aspeto cultural	Densidade da colónia	Coloração	Frete de crescimento	Aspeto à transparência	Zonagem	Frutificação	Face inferior	Estruturas microscópicas
<b><i>Inonotus rickii</i></b>									
B001A	feltroso a cotonoso no centro	média	Citrinus - Sulphureus	RD	Heterogéneo	–	–	Margem Citrinus Centro Latericius	Clamidósporos; Sedas
B004B	feltroso	forte	Margem Purpureus Centro Flavus - Sulphureus	IN	Homogéneo	–	–	Idem face superior exceto coloração Purpureus	Clamidósporos; Sedas
B005A	feltroso a cotonoso no centro	média	Citrinus - Sulphureus	RD	Heterogéneo	–	–	Margem Citrinus Centro Falvus	Clamidósporos
B007A	feltroso forte	média	Cremeus - Flavus	RD	Homogéneo	–	–	Idem face superior	Clamidósporos em cadeia
B027B	cotonoso fraco	média	Olivaceus - Cremeus	RD	Homogéneo	–	–	Idem face superior	Clamidósporos em grande quantidade e em cadeia
B032B	feltroso a cotonoso no centro	média	Citrinus - Sulphureus	RD	Heterogéneo	–	–	Margem Citrinus Centro Falvus	Clamidósporos; Sedas
B044A	feltroso a cotonoso no centro	média	Citrinus - Sulphureus	RD	Heterogéneo	–	–	Citrinus com Afloramentos Latericius	Micélio
<b><i>Ganoderma spp.</i></b>									
B016A	feltroso forte	média a forte	Ochroleucus - Ochraceus	RD	Homogéneo	+	–	Idem face superior	Micélio
B035A	feltroso	média	Albus	RD	Homogéneo	+	–	Idem face superior	Clamidósporos; Cristais
B053A	feltroso fraco	média	Sulphureus - Cremeus	Regular com aflorescências dendríticas	Heterogéneo	+	–	Idem face superior exceto coloração Testaceus	Micélio
B057A	feltroso forte	média a forte	Ochroleucus - Ochraceus	RD	Homogéneo	+	–	Idem face superior	Micélio

**Quadro 4.2.** Caracterização cultural e morfológica dos 11 isolados escolhidos para o ensaio de crescimento, em meio MEA (RD, regular e difusa. IN, irregular e nítida. –, ausente. +, presente)

<b>Código isolado</b>	<b>Aspeto cultural</b>	<b>Densidade da colônia</b>	<b>Coloração</b>	<b>Frente de crescimento</b>	<b>Aspeto à transparência</b>	<b>Zonagem</b>	<b>Frutificação</b>	<b>Face inferior</b>	<b>Estruturas microscópicas</b>
<b><i>Inonotus rickii</i></b>									
<b>B001A</b>	feltroso	fraca	Sulphureus Centro Latericius	RD	Heterogéneo	–	–	Idem face superior	Sedas
<b>B004B</b>	cotonoso	fraca	Luteus	RD	Homogéneo	–	–	Idem face superior	Micélio
<b>B005A</b>	feltroso	fraca	Sulphureus Centro Flavus	RD	Heterogéneo	–	–	Idem face superior	Clamidósporos; Sedas
<b>B007A</b>	feltroso fraco	fraca	Stramineus	RD	Homogéneo	–	–	Idem face superior	Grampos de conexão adjacentes
<b>B027B</b>	feltroso fraco	fraca	Stramineus	RD	Homogéneo	–	–	Idem face superior	Clamidósporos; Sedas; Grampos de conexão em extensão
<b>B032B</b>	feltroso	fraca	Sulphureus Centro Flavus	RD	Heterogéneo	–	–	Idem face superior	Clamidósporos; Sedas em menor quantidade
<b>B044A</b>	feltroso	fraca	Sulphureus Centro Flavus	RD	Heterogéneo	–	–	Idem face superior	Micélio
<b><i>Ganoderma spp.</i></b>									
<b>B016A</b>	feltroso fraco	fraca a média	Albus	RD	Heterogéneo	+	–	Idem face superior	Micélio muito fino; Cristais
<b>B035A</b>	pulverulento	fraca	Albus	RD	Homogéneo	–	–	Idem face superior	Micélio muito fino; Clamidósporos; Cristais
<b>B053A</b>	feltroso fraco	fraca	Stramineus	RD	Homogéneo	+	–	Idem face superior	Cristais com coloração; Vários grampos de conexão
<b>B057A</b>	feltroso fraco	fraca a média	Albus	RD	Heterogéneo	+	–	Idem face superior	Micélio



**Quadro 5.1.** Matriz de similaridade das sequências nucleotídicas alinhadas de *Daldinia concentrica* para a região ITS do rDNA

	8A	36A	54A	KT192354	AF176954	AF176955	AF176957	AF176983
8A								
36A	0,00							
54A	0,00	0,00						
KT192354 <i>D. childiae</i>	0,05	0,04	0,04					
AF176954 <i>D. concentrica</i>	0,00	0,00	0,00	0,04				
AF176955 <i>D. concentrica</i>	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00			
AF176957 <i>D. concentrica</i>	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00		
AF176983 <i>Entoleuca mammata</i>	0,33	0,32	0,32	0,35	0,32	0,32	0,32	





**Quadro 5.2.** Matriz de similaridade das sequências nucleotídicas alinhadas de *Ganoderma* sp. para a região ITS do rDNA

	GR475	GR573	GR571	GR572	35A	60A	61A	16A	53A	EF060007	AM906060	AM906061	AF026672	AM269826	AM269773	AY787672	AY884178	KU219991	TVU27080	
GR475																				
GR573	0,00																			
GR571	0,00	0,00																		
GR572	0,00	0,00	0,00																	
35A	0,00	0,00	0,00	0,00																
60A	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00															
61A	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00														
16A	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03													
53A	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00												
EF060007 <i>G. resinaceum</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03											
AM906060 <i>G. resinaceum</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,00										
AM906061 <i>G. resinaceum</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,00	0,00									
AF026672 <i>G. australe</i>	3,18	3,18	3,18	3,18	3,18	3,18	3,18	3,12	3,12	3,18	3,18	3,18								
AM269826 <i>G. adspersum</i>	4,08	4,08	4,08	4,08	4,08	4,08	4,08	3,94	3,94	4,08	4,08	4,08	3,34							
AM269773 <i>G. lucidum</i>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	3,21	4,01						
AY787672 <i>G. applanatum</i>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04	0,04	0,02	0,02	0,02	3,30	4,16	0,02					
AY884178 <i>G. applanatum</i>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04	0,04	0,02	0,02	0,02	3,30	4,15	0,02	0,00				
KU219991 <i>G. lingzhi</i>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	3,23	4,09	0,03	0,02	0,02			
TVU27080 <i>Trametes versicolor</i>	3,24	3,24	3,24	3,24	3,24	3,24	3,24	3,13	3,13	3,24	3,24	3,24	0,03	3,36	3,28	3,36	3,36	3,29		



```

          710      720      730      740      750
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
3B      AACATTTGACTCCTTTGACCTCCAATCAG--GGAGGAA-TAACCGCTGAACTTA
19A      AACCATTTGACTCCTTTGACCCACAA-CAG--GGAGGAC-TACCCGCTGAACTTA
AY340022 AACCATTTGACTCCTTTGACCTCAAATCAG--GTAGGAC-TACCCGCTGAACTTA
EF442330 AACCATTTGACTCCTTTGACCTCAAATCAG--GTAGGAC-TACCCGCTGAACTTA
GU461953 AACCATTTGACTCCTTTGACCTCAAATCAG--GTAGGAC-TACCCGCTGAACTTA
AF515585 AACCATTTGACTCCTTTGACCTCAAATCAG--GTAGGTC-TACCCGCTGAACTTA
AF385165 GCCCGGCCGAGACCTTTTGTGACGGAGCTGCGGTAGAGCATGTATGTTGGGACCC
AF515573 ---CATTTGACACCTT-GACCTCAAATCAG--GTAGGAT-TACCCGCTGAACTTA

```

**Quadro 5.3.** Matriz de similaridade das seqüências nucleotídicas alinhadas de *Phellinus* sp. para a região ITS do rDNA

	3B	19A	AY340022	EF442330	GU461953	AF515585	AF385165	AF515573
<b>3B</b>								
<b>19A</b>	0,10							
<b>AY340022 <i>F. mediterranea</i></b>	0,03	0,09						
<b>EF442330 <i>F. mediterranea</i></b>	0,03	0,09	0,00					
<b>GU461953 <i>F. mediterranea</i></b>	0,03	0,09	0,00	0,00				
<b>AF515585 <i>F. mediterranea</i></b>	0,04	0,09	0,00	0,00	0,00			
<b>AF385165 <i>Stereum hirsutum</i></b>	1,27	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25		
<b>AF515573 <i>Phellinus igniarius</i></b>	0,28	0,33	0,24	0,24	0,24	0,24	1,20	



210 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
01A -----TAAAAAGAGAGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATGTTACAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
05A G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAGCGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
31A G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAGCGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
47A -----TGAGAAAACAGGGGGTGAATCGCGAAAACATAGACTGAATTATATTCGCTACCCCTTTGTATAGTTTGTGACCGTTTGGC---TCCTT  
59A A---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAGCGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
KR905931 G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGARCGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
KF147913 G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
HM362909 G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
HM362908 G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAGCGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
HM362907 G---AGGAGCGC-----AAAGC-----TTTTGGCTAAATTT--ATAAACACCTTTTGTGTTAAATGTGAATGTAATGC---TCCTC  
HM362906 G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAGCGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
HM362905 G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
HM362904 G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAGCGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
HM362903 T---AAGAGAAG-----AGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
HM362902 G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
HM362901 G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
GU111925 G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
GU111924 ----AGGAGCGC-----AAAGC-----TTTTGGCTAAATTT--ATAAACACCTTTTGTGTTAA--TGTGAATGTAATGC---TCCTC  
GU111923 ----AGGAGCGC-----AAAGC-----TTTTGGCTAAATTT--ATAAACACCTTTTGTGTTAA--TGTGAATGTAATGC---TCCTC  
GU111922 T---AAGAGAAG-----AGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
GU111921 T---AAGAGAAG-----AGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
FJ667753 G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
AB811865 A---GGAAAGCGTTGAGAGGAGAAAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
AY072027 G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAGCGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
AY072025 G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAGCGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
GU016326 T---AAGAGAAG-----AGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
HQ589221 T---AAGAGAAG-----AGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
HQ589217 T---AAGAGAAG-----AGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
HQ589216 T---AAGAGAAG-----AGAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
FJ860053 G---AAAACGTTCAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAGCGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
GQ253461 G---AAAACGTTTAAAAAAGGGTGAAGGGCGAACGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTGTATTGTTATGTGAATGTAATGC---TCCTT  
GU111920 G---GGGAGAGG-----GCGCGGTGAATGTAATGCTTCGAGTTTGA--TTACAACTACTTGTATGCTTGTGAATGTAATGCTCCCTT  
GU068592 ----GGGAACGTTAAGAGAAGAGAGGGTGAAGGGCGAGCGCTTTGACTAGTTTATATTATAAACCCCTTTTATTGTTA--TGTGAATGTAATGC---TCCTT

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400  
01A GAGGGCGATAAT----GAAGTACAACCTTCAACAACCGGAGCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCATCG--AAATGCGATAGGTAATGGGAATTGC  
05A GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
31A GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
47A GTGGGCGATAAT----GCTCC-CTACTTTCAACAACGAATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
59A GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
KR905931 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
KF147913 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
HM362909 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
HM362908 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
HM362907 GTGGGCGATAATGAAATAAATAACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
HM362906 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
HM362905 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
HM362904 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
HM362903 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
HM362902 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
HM362901 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
GU111925 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
GU111924 GTGGGCGATAATGAAATAAATAACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
GU111923 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
GU111922 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
GU111921 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
FJ667753 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
AB811865 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
AY072027 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
AY072025 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
GU016326 GTGGGCGATTAA----TGAAGTACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
HQ589221 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCAATAAGTAATTTAAATGGC  
HQ589217 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCAATAAGTAATTTAAATGGC  
HQ589216 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
FJ860053 GTGGGCGATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
GQ253461 GTGGGCAATAAT----GAAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATAAAAACGCAGCG--AAATGCGATAATTTAAATGTGAATTGC  
GU111920 GTGGGCAAAAAT----GTAATACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
GU068592 GTGGGCGATAAT----TTGTACAACCTTCAACAACCGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAACGCAGCG--AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500  
01A AGAAGTCACTGAATCATCTAATCTTTGAACGCACCTTGGCCCTTTGGTATCCGAGGGGCGTCCCTGTGTGAGTGTCTGTT--AATCTCAA-----  
05A AGAATTCAGTGAATCATGAACTTTGAACGCACCTTGGCCCTTTGGTATCCGAGGGGATGCTCTTTGAGTGTCTGTT--AATCTCAA-----  
31A AGAATTCAGTGAATCATGAACTTTGAACGCACCTTGGCCCTTTGGTATCCGAGGGGATGCTCTTTGAGTGTCTGTT--AATCTCAA-----  
47A AGAATTCAGTGAATCATGAACTTTGAACGCACCTTGGCCCTTTGA--ATTCTTAGGGCC--CGCCGTTTTCAGAGG--GTGT--GCCCGCTGA-----





**Quadro 5.4.** Matriz de similaridade das sequências nucleotídicas alinhadas de *Inonotus rickii* para a região ITS do rDNA.

	31A	01A	47A	59A	05A	KR905931	KF147913	HM362909	HM362908	HM362907
31A										
01A	0,07									
47A	0,21	0,22								
59A	0,00	0,07	0,21							
05A	0,00	0,07	0,21	0,00						
KR905931 <i>I. rickii</i>	0,00	0,07	0,21	0,00	0,00					
KF147913 <i>I. rickii</i>	0,00	0,07	0,21	0,00	0,00	0,00				
HM362909 <i>I. rickii</i>	0,01	0,07	0,21	0,01	0,01	0,01	0,01			
HM362908 <i>I. rickii</i>	0,00	0,07	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01		
HM362907 <i>I. rickii</i>	0,14	0,21	0,33	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	
HM362906 <i>I. rickii</i>	0,00	0,07	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,14
HM362905 <i>I. rickii</i>	0,01	0,07	0,21	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,15
HM362904 <i>I. rickii</i>	0,01	0,08	0,22	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,15
HM362903 <i>I. rickii</i>	0,01	0,07	0,21	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,15
HM362902 <i>I. rickii</i>	0,01	0,07	0,21	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,15
HM362901 <i>I. rickii</i>	0,01	0,07	0,21	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,15
HM362900 <i>I. rickii</i>	0,01	0,07	0,21	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,15
GU111925 <i>I. rickii</i>	0,01	0,07	0,21	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,14
GU111924 <i>I. rickii</i>	0,14	0,20	0,32	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,01
GU111923 <i>I. rickii</i>	0,14	0,20	0,32	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,01
GU111922 <i>I. rickii</i>	0,01	0,07	0,20	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,15
GU111921 <i>I. rickii</i>	0,01	0,07	0,21	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,14
FJ667753 <i>I. rickii</i>	0,00	0,06	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,14
AB811865 <i>I. rickii</i>	0,03	0,10	0,23	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,15
AY072027 <i>I. rickii</i>	0,00	0,07	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,15
AY072025 <i>I. rickii</i>	0,00	0,07	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,14
GU016326 <i>I. rickii</i>	0,02	0,08	0,21	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,14
HQ589221 <i>I. rickii</i>	0,06	0,11	0,26	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,20
HQ589217 <i>I. rickii</i>	0,06	0,11	0,26	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,21
HQ589216 <i>I. rickii</i>	0,01	0,07	0,21	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,15
FJ860053 <i>I. rickii</i>	0,00	0,07	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,15
GQ253461 <i>I. rickii</i>	0,03	0,09	0,21	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,17
GU111920 <i>Inocutis tamaricis</i>	0,20	0,26	0,36	0,20	0,20	0,20	0,20	0,21	0,20	0,26
GU068592 <i>I. hispidus</i>	0,04	0,10	0,23	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,16

**Quadro 5.4.** (continuação da página anterior)

	HM362906	HM362905	HM362904	HM362903	HM362902	HM362901	HM362900	GU111925	GU111924	GU111923
31A										
01A										
47A										
59A										
05A										
KR905931 <i>I. rickii</i>										
KF147913 <i>I. rickii</i>										
HM362909 <i>I. rickii</i>										
HM362908 <i>I. rickii</i>										
HM362907 <i>I. rickii</i>										
HM362906 <i>I. rickii</i>										
HM362905 <i>I. rickii</i>	0,00									
HM362904 <i>I. rickii</i>	0,01	0,01								
HM362903 <i>I. rickii</i>	0,01	0,01	0,02							
HM362902 <i>I. rickii</i>	0,01	0,01	0,01	0,01						
HM362901 <i>I. rickii</i>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01					
HM362900 <i>I. rickii</i>	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00	0,01				
GU111925 <i>I. rickii</i>	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01			
GU111924 <i>I. rickii</i>	0,14	0,15	0,15	0,15	0,14	0,15	0,15	0,14		
GU111923 <i>I. rickii</i>	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,00	
GU111922 <i>I. rickii</i>	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,15	0,14
GU111921 <i>I. rickii</i>	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00	0,14	0,14
FJ667753 <i>I. rickii</i>	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,14	0,14
AB811865 <i>I. rickii</i>	0,04	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	0,03	0,04	0,15	0,15
AY072027 <i>I. rickii</i>	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,14	0,14
AY072025 <i>I. rickii</i>	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,14	0,14
GU016326 <i>I. rickii</i>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,14	0,14
HQ589221 <i>I. rickii</i>	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,20	0,20
HQ589217 <i>I. rickii</i>	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,20	0,20
HQ589216 <i>I. rickii</i>	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,15	0,14
FJ860053 <i>I. rickii</i>	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,14	0,14
GQ253461 <i>I. rickii</i>	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,17	0,16
GU111920 <i>Inocutis tamaricis</i>	0,20	0,20	0,21	0,20	0,20	0,20	0,20	0,21	0,25	0,25
GU068592 <i>I. hispidus</i>	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,16	0,16

**Quadro 5.4.** (continuação da página anterior)

	GU111922	GU111921	FJ667753	AB811865	AY072027	AY072025	GU016326	HQ589221	HQ589217	HQ589216
31A										
01A										
47A										
59A										
05A										
KR905931 <i>I. rickii</i>										
KF147913 <i>I. rickii</i>										
HM362909 <i>I. rickii</i>										
HM362908 <i>I. rickii</i>										
HM362907 <i>I. rickii</i>										
HM362906 <i>I. rickii</i>										
HM362905 <i>I. rickii</i>										
HM362904 <i>I. rickii</i>										
HM362903 <i>I. rickii</i>										
HM362902 <i>I. rickii</i>										
HM362901 <i>I. rickii</i>										
HM362900 <i>I. rickii</i>										
GU111925 <i>I. rickii</i>										
GU111924 <i>I. rickii</i>										
GU111923 <i>I. rickii</i>										
GU111922 <i>I. rickii</i>										
GU111921 <i>I. rickii</i>	0,01									
FJ667753 <i>I. rickii</i>	0,00	0,01								
AB811865 <i>I. rickii</i>	0,03	0,04	0,03							
AY072027 <i>I. rickii</i>	0,01	0,01	0,00	0,03						
AY072025 <i>I. rickii</i>	0,01	0,01	0,00	0,03	0,00					
GU016326 <i>I. rickii</i>	0,02	0,02	0,01	0,04	0,02	0,02				
HQ589221 <i>I. rickii</i>	0,06	0,06	0,05	0,09	0,06	0,06	0,07			
HQ589217 <i>I. rickii</i>	0,06	0,07	0,06	0,09	0,06	0,06	0,07	0,00		
HQ589216 <i>I. rickii</i>	0,01	0,01	0,00	0,03	0,01	0,01	0,02	0,05	0,06	
FJ860053 <i>I. rickii</i>	0,01	0,01	0,00	0,04	0,00	0,00	0,02	0,06	0,06	0,01
GQ253461 <i>I. rickii</i>	0,03	0,04	0,03	0,05	0,03	0,03	0,04	0,09	0,09	0,03
GU111920 <i>Inocutis tamaricis</i>	0,20	0,21	0,20	0,21	0,20	0,20	0,20	0,26	0,26	0,20
GU068592 <i>I. hispidus</i>	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,05	0,09	0,09	0,04

**Quadro 5.4.** (continuação da página anterior)

	<b>FJ860053</b>	<b>GQ253461</b>	<b>GU111920</b>	<b>GU068592</b>
31A				
01A				
47A				
59A				
05A				
KR905931 <i>I. rickii</i>				
KF147913 <i>I. rickii</i>				
HM362909 <i>I. rickii</i>				
HM362908 <i>I. rickii</i>				
HM362907 <i>I. rickii</i>				
HM362906 <i>I. rickii</i>				
HM362905 <i>I. rickii</i>				
HM362904 <i>I. rickii</i>				
HM362903 <i>I. rickii</i>				
HM362902 <i>I. rickii</i>				
HM362901 <i>I. rickii</i>				
HM362900 <i>I. rickii</i>				
GU111925 <i>I. rickii</i>				
GU111924 <i>I. rickii</i>				
GU111923 <i>I. rickii</i>				
GU111922 <i>I. rickii</i>				
GU111921 <i>I. rickii</i>				
FJ667753 <i>I. rickii</i>				
AB811865 <i>I. rickii</i>				
AY072027 <i>I. rickii</i>				
AY072025 <i>I. rickii</i>				
GU016326 <i>I. rickii</i>				
HQ589221 <i>I. rickii</i>				
HQ589217 <i>I. rickii</i>				
HQ589216 <i>I. rickii</i>				
FJ860053 <i>I. rickii</i>				
GQ253461 <i>I. rickii</i>	0,03			
GU111920 <i>Inocutis tamaricis</i>	0,20	0,21		
GU068592 <i>I. hispidus</i>	0,04	0,07	0,21	

## Anexo 6

**Alinhamento múltiplo das sequências da região LSU do rDNA dos isolados em estudo, incluindo as sequências dos isolados retirados do NCBI e respectivas matrizes de similaridade obtidas após alinhamento das sequências nucleotídicas.**

### Daldinia concentrica

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
08A   TAGT--ACGGCGAG--TGA-GCGGCAACAGCTCAAATTT-GAAATCTGGCCCTAGCGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTTAGGTGCCT
36A   TAGT--ACGGCGAG--TGA-GCGGCAACAGCTCAAATTT-GAAATCTGGCCCTAGCGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTTAGGTGCCT
54A   TAGT--ACGGCGAG--TGA-GCGGCAACAGCTCAAATTT-GAAATCTGGCCCTAGCGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTTAGGTGCCT
EF562505 TAGT-AACGGCGAG--TGAAGCGGCAACAGCTCAAATTT-GAAATCTGGCCCTAGCGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTTAGGTGCCT
KT281895 TAGTAAACGGCGAAGTTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTTGAATCTGGCCCTAGCGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTTAGGTGCCT
KT323236 TAGT--ACGGCGAG--TGAAGCGGCAACAGCTCAAATTT-GAAATCTGGCCCTAGCGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTTAGGTGCCT
KJ130993 TAGT-AACGGCGAG--TGAAGCGGCAACAGCTCAAATTT-GAAATCTGGCCCTTTG-GTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTTAGGTGCCT

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
08A   TCTGAGTTCCTTGAACGGGACGCCAGAGAGGGTGTAGAGCCCCGTACGGTTGGACACCGAGCCTCTATATAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGA
36A   TCTGAGTTCCTTGAACGGGACGCCAGAGAGGGTGTAGAGCCCCGTACGGTTGGACACCGAGCCTCTATATAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGA
54A   TCTGAGTTCCTTGAACGGGACGCCAGAGAGGGTGTAGAGCCCCGTACGGTTGGACACCGAGCCTCTATATAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGA
EF562505 TCCGAGTTCCTTGAACGGGACGCCAGAGAGGGTGTAGAGCCCCGTACGGTTGGACACCGAGCCTCTATATAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGA
KT281895 TCTGAGTTCCTTGAACGGGACGCCAGAGAGGGTGTAGAGCCCCGTACGGTTGGACACCGAGCCTCTATATAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGA
KT323236 TCTGAGTTCCTTGAACGGGACGCCAGAGAGGGTGTAGAGCCCCGTACGGTTGGACACCGAGCCTCTATATAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGA
KJ130993 TCCGAGTTCCTTGAATGGGACGCCGTAGAGGGTGTAGAGCCCCGTATGGTTGGACACCGAGCCTCTGTATAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGA

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
08A   ATGCTGCTCTAAATGGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATACCGGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGTACTTTGA
36A   ATGCTGCTCTAAATGGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATACCGGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGTACTTTGA
54A   ATGCTGCTCTAAATGGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATACCGGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGTACTTTGA
EF562505 ATGCTGCTCTAAATGGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATACCGGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGTACTTTGA
KT281895 ATGCTGCTCTAAATGGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATACCGGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGTACTTTGA
KT323236 ATGCTGCTCTAAATGGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATACCGGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGTACTTTGA
KJ130993 ATGCTGCTCTAAATGGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATACTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGTACTTTGA

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
08A   AAAGAGGGTTAAATAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGCGTTTGCACACAGACTTTTTCCAGGCGGATCATCCGGTGTCTCACCGGTGCACCTTCGCC
36A   AAAGAGGGTTAAATAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGCGTTTGCACACAGACTTTTTCCAGGCGGATCATCCGGTGTCTCACCGGTGCACCTTCGCC
54A   AAAGAGGGTTAAATAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGCGTTTGCACACAGACTTTTTCCAGGCGGATCATCCGGTGTCTCACCGGTGCACCTTCGCC
EF562505 AAAGAGGGTTAAATAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGCGTTTGCACACAGACTTTTTCCAGGCGGATCATCCGGTGTCTCACCGGTGCACCTTCGCC
KT281895 AAAGAGGGTTAAATAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGCGTTTGCACACAGACTTTTTCCAGGCGGATCATCCGGTGTCTCACCGGTGCACCTTCGCC
KT323236 AAAGAGGGTTAAATAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGCGTTTGCACACAGACTTTTTCCAGGCGGATCATCCGGTGTCTCACCGGTGCACCTTCGCC
KJ130993 AAAGAGAGTTAAATAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGCGTCTACGACAGACTTTTTCCAGGCGGATCATCCGGTGTCTCACCGGTGCACCTTCGCC

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
08A   TGGTTTAGGCCAGCATCGGTTCTCTTAGGGGGATAAAGCCCTGGGGAACGTAGCTCCTTCGGGAGTGTATAGCCCCCTTGCCTAATACCCCTTCGGGGGAC
36A   TGGTTTAGGCCAGCATCGGTTCTCTTAGGGGGATAAAGCCCTGGGGAACGTAGCTCCTTCGGGAGTGTATAGCCCCCTTGCCTAATACCCCTTCGGGGGAC
54A   TGGTTTAGGCCAGCATCGGTTCTCTTAGGGGGATAAAGCCCTGGGGAACGTAGCTCCTTCGGGAGTGTATAGCCCCCTTGCCTAATACCCCTTCGGGGGAC
EF562505 TGGTTTAGGCCAGCATCGGTTCCCTTAGGGGGATAAAGCCCTGGGGAACGTAGCTCCTTCGGGAGTGTATAGCCCCCTAGCGTAATACCCCTTCGGGGGAC
KT281895 TGGTTTAGGCCAGCATCGGTTCTCTTAGGGGGATAAAGCCCTGGGGAACGTAGCTCCTTCGGGAGTGTATAGCCCCCTTGCCTAATACCCCTTCGGGGGAC
KT323236 TGGTTTAGGCCAGCATCGGTTCCCTTAGGGGGATAAAGCCCTGGGGAACGTAGCTCCTTCGGGAGTGTATAGCCCCCTAGCGTAATACCCCTTCGGGGGAC
KJ130993 AGGGAGAGGCCAGCATCGGTTCTCTTAGGGGGATAAAGCCCTGGGGAACGTAGCTCCTTCGGGAGTGTATAGCCCCCTTGCCTAATACCCCTTCGGGGGAC

      510     520     530     540     550     560
08A   CGAGGAACCGCCATCTGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCGTCACGACCCCGTCTTGAACAC-GGACC
36A   CGAGGAACCGCCATCTGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCGTCACGACCCCGTCTTGAACAC-GGACC
54A   CGAGGAACCGCCATCTGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCGTCACGACCCCGTCTTGAACAC-GGACC
EF562505 CGAGGAACCGCCATCTGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCGTCACGACCCCGTCTTGAACACCGGACCA
KT281895 CGAGGAACCGCCATCTGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCGTCACGACCCCGTCTTGAACAC-GGACC
KT323236 CGAGGAACCGCCATCTGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCGTCAC-----
KJ130993 CGAGGACCGCCTTCGGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCGTCACGACCCCGTCTTGAACAC-GGACC
```

**Quadro 6.1.** Matriz de similaridade das sequências nucleotídicas alinhadas de *Daldinia concentrica* para a região LSU do rDNA.

	08A	36A	54A	EF562505	KT281895	KT323236	KJ130993
08A							
36A	0,00						
54A	0,00	0,00					
EF562505 <i>D. childiae</i>	0,01	0,01	0,01				
KT281895 <i>D. concentrica</i>	0,00	0,00	0,00	0,01			
KT323236 <i>D. childiae</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01		
KJ130993 <i>Xylaria telfairii</i>	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	





**Quadro 6.2.** Matriz de similaridade das sequências nucleotídicas alinhadas de *Ganoderma* sp. para a região LSU do rDNA

	16A	35A	53A	60A	61A	GR475	GR571	GR572	GR573	KU220019	AM269830	AM269837	AY515339	KU220014	AM269825
<b>16A</b>															
<b>35A</b>	0,03														
<b>53A</b>	0,00	0,03													
<b>60A</b>	0,01	0,02	0,01												
<b>61A</b>	0,04	0,01	0,04	0,04											
<b>GR475</b>	0,00	0,02	0,00	0,00	0,04										
<b>GR571</b>	0,01	0,02	0,01	0,00	0,04	0,00									
<b>GR572</b>	0,06	0,03	0,06	0,05	0,01	0,05	0,05								
<b>GR573</b>	0,00	0,02	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,05							
<b>KU220019 <i>G. lingzhi</i></b>	0,00	0,02	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,05	0,00						
<b>AM269830 <i>G. lucidum</i></b>	0,01	0,03	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01	0,06	0,01	0,01					
<b>AM269837 <i>G. resinaceum</i></b>	0,01	0,02	0,01	0,00	0,04	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,01				
<b>AY515339 <i>G. applanatum</i></b>	0,01	0,04	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01	0,07	0,01	0,01	0,02	0,01			
<b>KU220014 <i>G. applanatum</i></b>	0,00	0,03	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01		
<b>AM269825 <i>Fomes fasciatus</i></b>	0,04	0,06	0,04	0,04	0,07	0,04	0,04	0,08	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	

Phellinus spp.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
03B    TGCGAGTGA-GCGGGAAGAGCTCAAATTTAAAATCTGGCAGTCTTCTGGCTGTCCGAGTTGTAATCTGGAGAAGCGTTTCTGTGTTAGACCGGTGTACAA
19A    TGCGAGTGA-GCGGGAAGAGCTCAAATTTAAAATCTGGCAGTCTTCTGGCTGTCCGAGTTGTAATCTGGAGAAGCGTTTCTGTGTTAGACCGGTGTACAA
AY618202 TGCGAGTGAAGCGGGGAAGAGCTCAAATTTAAAATCTGACAGTCTTCTGGCTGTCCGAGTTGTAATCTGGAGAAGCGTTTCTGTGTTAGACCGGTGTACAA
AY618203 TGCGAGTGAAGCGGGGAAGAGCTCAAATTTAAAATCTGACAGTCTTCTGGCTGTCCGAGTTGTAATCTGGAGAAGCGTTTCTGTGTTAGACCGGTGTACAA
GU461981 TGCGAGTGAAGCGGGGAAGAGCTCAAATTTAAAATCTGGCAGTCTTCTGGCTGTCCGAGTTGTAATCTGGAGAAGCGTTTCTGTGTTAGACCGGTGTACAA
DQ122397 TGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGCAGTCTC---GTTGCCGAGTTGTAATCTGGAGAAGCGTTTCCGCTGCTGGACCGGTGTACAA

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
03B    GTCTCCTGGAACGGAGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCCATGACACGGACTACTAATACTTTGTGATACGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTGGGAA
19A    GTCTCCTGGAACGGAGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCCATGACACGGACTACTAATACTTTGTGATACGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTGGGAA
AY618202 GTCTCCTGGAACGGAGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCCATGACACGGACTACTAATACTTTGTGATACGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTGGGAA
AY618203 GTCTCCTGGAACGGAGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCCATGACACGGACTACTAATACTTTGTGATACGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTGGGAA
GU461981 GTCTCCTGGAACGGAGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCCATGACACGGACTACTAATACTTTGTGATACGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTGGGAA
DQ122397 GTCTCCTGGAATAGAGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCCATGACACGGACTGCCAGTCTTTGTGATACGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTGGGAA

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
03B    TGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAGATGAAAAGCACATTTGGA
19A    TGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAGATGAAAAGCACATTTGGA
AY618202 TGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAGATGAAAAGCACATTTGGA
AY618203 TGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAGATGAAAAGCACATTTGGA
GU461981 TGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAGATGAAAAGCACATTTGGA
DQ122397 TGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAGATGAAAAGCACATTTGGA

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
03B    AAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGTCGCGCTGTGCAGAACTCAGCCTTGCCCTCGGCTTGGTGTACTTTCTGC
19A    AAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGTCGCGCTGTGCAGAACTCAGCCTTGCCCTCGGCTTGGTGTACTTTCTGC
AY618202 AAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGTCGCGCTGTGCAGAACTCAGCCTTGCCCTCAGCTTGGTGTACTTTCTGC
AY618203 AAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGTCGCGCTGTGCAGAACTCAGCCTTGCCCTCAGCTTGGTGTACTTTCTGC
GU461981 AAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGTCGCGCTGTGCAGAACTCAGCCTTGCCCTCGGCTTGGTGTACTTTCTGC
DQ122397 AAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGTCGCGCTTGTCTGACTCAGCCTTGCCCTCGGCTTGGTGTATTTCAAGT

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
03B    ACAACGGGTCAACATCAATTTTGGCCCATGGAGAAAGGTAGGGGGAATGTAGCGCTGTTTCGGCAGCGTGTATAGCCCTCTATTG-TATACATGGGCTG
19A    ACAACGGGTCAACATCAATTTTGGCCCATGGAGAAAGGTAGGGGGAATGTAGCGCTGTTTCGGCAGCGTGTATAGCCCTCTATTG-TATACATGGGCTG
AY618202 ACAACGGGTCAACATCAATTTTGGCCCATGGAGAAAGGTAGGGGGAATGTAGCGCTGTTTCGGCAGCGTGTATAGCCCTCTATTGGTATACATGGGTTG
AY618203 ACAACGGGTCAACATCAATTTTGGCCCATGGAGAAAGGTAGGGGGAATGTAGCGCTGTTTCGGCAGCGTGTATAGCCCTCTATTGGTATACATGGGTTG
GU461981 ACAACGGGTCAACATCAATTTTGGCCCATGGAGAAAGGTAGGGGGAATGTAGCGCTGTTTCGGCAGCGTGTATAGCCCTCTATTG-TATACATGGGCTG
DQ122397 AGGACGGGTCAACATCGATTTTGAACCGGTGACAAAGGAGGGAGGAATGTGGCAGTCTTTCGGG--GTGTGTATAGCCCTCYTTCA-TATACATCGGCTG

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
03B    GGATTGAGGATCGCAGCACGCCCTTGTGGCCGGGGGTTTCGCCCTACGTACCGTGTCTGGGATGTTGGCAGAATGGCTTTAAGCGACCCGCTCTGAAACAC
19A    GGATTGAGGATCGCAGCACGCCCTTGTGGCCGGGGGTTTCGCCCTACGTACCGTGTCTGGGATGTTGGCAGAATGGCTTTAAGCGACCCGCTCTGAAACAC
AY618202 GGATTGAGGATTCAGCACGCCCTTGTGGCCGGGGGTTTCGCCCTACGTACCGTGTCTAGGATGTTGGCAGAATGGCTTTAAGCGACCCGCTCTGAAACAC
AY618203 GGATTGAGGATTCAGCACGCCCTTGTGGCCGGGGGTTTCGCCCTACGTACCGTGTCTAGGATGTTGGCAGAATGGCTTTAAGCGACCCGCTCTGAAACAC
GU461981 GGATTGAGGATTCAGCACGCCCTTGTGGCCGGGGGTTTCGCCCTACGTACCGTGTCTGGGATGTTGGCAGAATGGCTTTAAGCGACCCGCTCTGAAACAC
DQ122397 GGATCGAGGCCCGCAGCGGCCCTTGTGGCCGGAGGTTTCGCCCTACGTATCGCGCTTAGGATGTTGGCATAATGGCTTTAAGCGACCCGCTCTGAAACAC

      ....|..
03B    CGGACCA
19A    -GGACCA
AY618202 -GGACCA
AY618203 -GGACCA
GU461981 -GGACCA
DQ122397 -GGACCA
```

**Quadro 6.3.** Matriz de similaridade das seqüências nucleotídicas alinhadas de *Phellinus* sp. para a região LSU do rDNA

	<b>03B</b>	<b>19A</b>	<b>AY618202</b>	<b>AY618203</b>	<b>GU461981</b>	<b>DQ122397</b>
<b>03B</b>						
<b>19A</b>	0,00					
<b>AY618202 <i>F. pseudopunctata</i></b>	0,01	0,01				
<b>AY618203 <i>F. pseudopunctata</i></b>	0,01	0,01	0,00			
<b>GU461981 <i>F. pseudopunctata</i></b>	0,00	0,00	0,01	0,01		
<b>DQ122397 <i>Fuscoporia ferruginosa</i></b>	0,12	0,11	0,12	0,12	0,11	



AY059055 AAACGCTTGAAGTCAAGTCGCGCTCCGCGGAACTCAGCCTTGCTT--CGGCCTG-GTGTACTTTCCG-TCGGACGGGTCAACATCAGTTTTGGCCGGTGGGA

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

01A AAAAGGGAGAGGAATGGAGCGCCGCTTCGCGCGCGT-GGTATAGCCCTTTG-----TCCAACGCACCTGGCTGGGACTGA--AG---ACGCCGCCCGCC

05A AAAAGGCAGAGGGAATGTAGCGCCGCTTCGGTGGCGT-GTTATAGCCCTTTG-----TCAAATACACTGGCTGGGACTGA--GG---ACCGCAGCACGCC

31A AAAAGGCAGAGGGAATGTAGCGCCGCTTCGGTGGCGT-GTTATAGCCCTTTG-----TCAAATACACTGGCTGGGACTGA--GG---ACCGCAGCACGCC

47A AAAAAGGCAAAGGAATGGTACGCCCTTCGCTGGGCT-GGTAATACCCCTTG-----GCCAATTACCTGGGTGGGAATGG--AG---AACGCCACCCGGC

59A AAAAGGCAGAGGGAATGTAGCGCCGCTTCGGTGGCGT-GTTATAGCCCTTTG-----TCAAATACACTGGCTGGGACTGA--GG---ACCGCAGCACGCC

AM269843 AAAAGGCAGAGGGAATGTAGCGCCGCTTCGGTGGCGT-GTTATAGCCCTTTG-----TCAAATACACTGGCTGGGACTGA--GG---ACTGCAGCACGCC

AM269844 AAAAGGCAGAGGGAATGTAGCGCCGCTTCGGTGGCGT-GTTATAGCCCTTTG-----TCGAATACACTGGCGGGGACTGA--GG---ACTGCAGCACGCC

AY059042 AAAAGGCAGAGGGAATGTAGCGCCGCTTCGGCAGCGT-GTTATAGCCCTTTG-----TCTAATGCACCTGGCCGGGACTGA--GG---ACTGCAGCACGCC

AY059050 AAAAGGCAGAGGGAATGTAGCGCCCTTCGGTGGCGT-GTTATAGCCCTTTG-----TTGAATACACTGGCTGGGACTGA--GG---ACTGCAGCACGCC

AF311010 AAAAGGCAGAGGGAATGTAGCGCCCTTCGGTGGCGT-GTTATAGCCCTTTG-----TCGAATACACTGGCGGGGACTGA--GG---ACTGCAGCACGCC

AF311014 AAAAGGCAGAGGGAATGTAGCGCCGCTTCGGTGGCGT-GTTATAGCTCTCTG-----TCAAATACGCTGGCGGGGACTGA--GG---ACCGCAGCACGCC

AF515573 GTTGGACGTGGAAGCTGCTGGCCCTCTGTGGTTCG-GCTCTTCTTAAATGCATTAGCTGG-GCTTTGGCTCGCGTTGAACGGTGTAAATAGTAATCTTA

AY059055 GAAAGGTGAGGGAATGTAGCGCCGCTTCGCGCGCGT-GTTATAGCCCTTTG-----TCAGATACACTCGGTGGGACTGA--GG---CCGGCAGCACGCC

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700

01A CTTGGGCGGGGGTTCGCCCCACGTACCGTGCCTAAGATGTTGGCA-TAATGG-----CTTTAAGCGACCCGCTTTAAACCCCG-----GG

05A CTTGTGGCCGGGGTTCGCCCCACGTACCGTGCCTAAGATGTTGGCA-TAATGG-----CTTTAAGCGACCCGCTTTGAGACCCG-----TCTTG

31A CTTGTGGCCGGGGTTCGCCCCACGTACCGTGCCTAAGATGTTGGCA-TAATGG-----CTTTAAGCGACCCGCTTTGAT-CCCG-----TCTTG

47A CTTGGGCGGGGGTTCGCCCCACGGAACGGGTTAAGAAGGTGGCAATAAGGC-----TTTTAACCGACCCGCTTTGAAACCCCGAACACTTCCC

59A CTTGTGGCCGGGGTTCGCCCCACGTACCGTGCCTAAGATGTTGGCA-TAATGG-----CTTTAAGCGACCCGCTTTGAAACACGGACCAATCTTG

AM269843 CTTGTGGCCGGGGTTCGCCCCACGTT-CGTGCTTA-----

AM269844 CTTGTGGCCGGGGTTCGCCCCACGTACGTGCCTAAGATGTTGGCA-TAATGG-----CTTTAAGCGACCCG-----

AY059042 CTTGTGGCCGGGGTTCGCCCCACGTACGTGCCTAAGATGTTGGCA-TAATGG-----CTTTAAGCGACCCGCTTTGAAACACGGACCA--AGGA

AY059050 CTTGTGGCCGGGGTTCGCCCCACGTACCGTGCCTAAGATGTTGGCA-TAATGG-----CTTTAAGCGACCCGCTTTGAAACACGGACCA--AGGA

AF311010 CTTGTGGCCGGGGTTCGCCCCACGTACCGTGCCTAAGATGTTGGCA-TAATGG-----CTTTAAGCGACCCGCTTTGAAACACGGACCA--AGGA

AF311014 CTTGTGGCCGGGGTTCGCCCCACGTT-CGTGCTTACGTGTTGGCA-TAATGG-----CTTTAAGCGACCCGCTTTGAAACACGGACCA--AGGA

AF515573 CATTACCCGAGCGCTTGCCTGACGAGTCTGCTTCTAATCGTCCGTGTTTTCGGACAAGGTGCTTTGTGCGCTTCATTTGACACCTTGACCTCAAATCA

AY059055 TTTTGGCCGGGGTTCGCCCCACGTACGTGCCTAAGATGTTGGCA-TAATGG-----CTTTAAGCGACCCGCTTTGAAACACGGACCA--AGGA

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

01A ACCAACCCGGGACCAAAATGGAAAAAT-----

05A AACCCCGGACCAATGAGTCTTTC-----

31A AACCCCGGACCAA--ATTTCCT-----

47A TCTCTTTTTTTTTTCCATTTTC-----

59A AAACAC--GGACCAACAAATTTTAT-----

AM269843 -----

AM269844 -----

AY059042 GTCTAACATGCTTGCAGTGTTCGGGTGGAAAAACCTTCGCGCATAATGAAAGTGAAGTTGGGAACCTCCGCGAGGGGGTGCACCGACGCCCGCCCTGA

AY059050 GTCCAACATGCTTGCAGTGTTCGGGTGGAAAAACCTTCGCGCATAATGAAAGTGAAGTTGGGAACCTCCGCAAGGGGGTGCACCGACGCCCGCCCTGA

AF311010 GTCCAACATGCTTGCAGTGTTCGGGTGGAAAAACCTTCGCGCATAATGAAAGTGAAGTTGGGAACCTCCGCAAGGGGGTGCACCGACGCCCGCCCTGA

AF311014 GTCCAACATGCTTGCAGTGTTCGGGTGGTAAACCTTCGCGCATAATGAAAGTGAAGTTGGGACCTCCGCAAGGGGGTGCACCGACGCCCGCCCTGA

AF515573 GGTAGGATTACCCGCTGAACCTAA-----

AY059055 GTCTAACATGCTTGCAGTGTTCGGGTGGAAAAACCTTCGCGCATAATGAAAGTGAAGTTGGGAACCTCCGCAAGGGGGTGCACCGACGCCCGCCCTGA

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

01A -----

05A -----

31A -----

47A -----

59A -----

AM269843 -----

AM269844 -----

AY059042 AGTTCTCTGACGGTGTTCGGGTAGAGCAAGTATGTTGGGACCCGAAAGATGTTGAACATGCTGAAATAGGGCGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGC

AY059050 CGTTCTCTGACGGTGTTCGGGTAGAGCAAGTATGCTGGGACCCGAAAGATGTTGAACATGCTGAAATAGGGCGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGC

AF311010 CGTTCTCTGACGGTGTTCGGGTAGAGCAAGTATGCTGGGACCCGAAAGATGTTGAACATGCTGAAATAGGGCGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGC

AF311014 AGTTCTCTGACGGTGTTCGGGTAGAGCAAGTATGCTGGGACCCGAAAGATGTTGAACATGCTGAAATAGGGCGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGC

AF515573 -----

AY059055 CGTTCTCTGACGGTGTTCGGGTAGAGCAAGTATGCTGGGACCCGAAAGATGTTGAACATGCTGAAATAGGGCGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGC

910 920 930 940

01A -----

05A -----

31A -----

47A -----

59A -----

AM269843 -----

AM269844 -----

AY059042 TCGTAGCGATTCTGACGTGCAAAATCGATCGTCAAATTTGGG

AY059050 TCGTAGCGATTCTGACGTGCAAAATCGATCGTCAAATTTGGG

AF311010 TCGTAGCGATTCTGACGTGCAAAATCGATCGTCAAATTTGGG

AF311014 TCGTAGCGATTCTGACGTGCAAAATCGATCGTCAAATTTGGG

AF515573 -----

AY059055 TCGTAGCGATTCTGACGTGCAAAATCGATCGTCAAATTTGGG

**Quadro 6.4.** Matriz de similaridade das seqüências nucleotídicas alinhadas de *Inonotus rickii* para a região LSU do rDNA

	01A	05A	31A	47A	59A	AM269843	AM269844	AY059042	AY059050	AF311010	AF311014	AF515573
01A												
05A	0,05											
31A	0,05	0,00										
47A	0,12	0,18	0,18									
59A	0,04	0,01	0,01	0,17								
AM269843 <i>I. andersonii</i>	0,06	0,00	0,00	0,18	0,01							
AM269844 <i>I. andersonii</i>	0,06	0,01	0,01	0,19	0,02	0,01						
AY059042 <i>I. ulmicola</i>	0,08	0,03	0,03	0,20	0,04	0,03	0,03					
AY059050 <i>I. quercustris</i>	0,07	0,01	0,01	0,18	0,02	0,01	0,01	0,03				
AF311010 <i>I. cuticularis</i>	0,07	0,02	0,02	0,18	0,02	0,02	0,01	0,03	0,01			
AF311014 <i>I. hispidus</i>	0,07	0,02	0,02	0,20	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03	0,03		
AF515573 <i>Phellinus igniarius</i>	0,53	0,51	0,51	0,56	0,52	0,52	0,52	0,52	0,51	0,52	0,53	

