

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO *SCLERODERMA*
(BASIDIOMYCOTINA) ASSOCIADO A
POVOAMENTOS FLORESTAIS EXÓTICOS NO
BIOMA PAMPA, BRASIL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daiane Fiuza Montagner

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO *SCLERODERMA* (BASIDIOMYCOTINA)
ASSOCIADO A POVOAMENTOS FLORESTAIS EXÓTICOS NO BIOMA PAMPA,
BRASIL**

Daiane Fiuza Montagner

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, área de concentração em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia.**

Orientadora: Prof^a. Zaida Inês Antonioli

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

Fiuza Montagner, Daiane
Caracterização do gênero *Scleroderma* (Basidiomycotina)
associado a povoamentos florestais exóticos no Bioma
Pampa, Brasil / Daiane Fiuza Montagner .- 2014.
50 f.; 30cm

Orientadora: Zaida Inês Antoniolli
Coorientadora: Andressa Silveira de Oliveira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2014

1. Scleroderma 2. Biologia Molecular 3. Região ITS
4. Sistemática I. Antoniolli, Zaida Inês II. Silveira
de Oliveira , Andressa III. Título.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da
Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pela autora.

© 2014

Todos os direitos reservados a Daiane Fiuza Montagner. A reprodução de partes ou
do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Laurindo José de Souza, 353, Bairro Barra da Lagoa, Florianópolis –
SC. CEP: 88061-400.

E-mail: daiafiuza@hotmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA

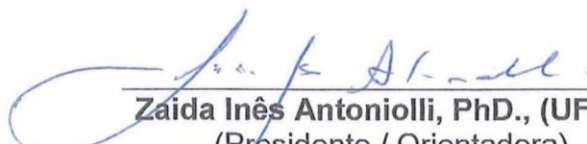
A comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

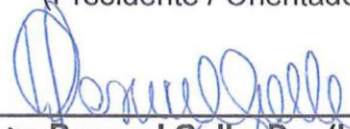
CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO *SCLERODERMA* (BASIDIOMYCOTINA)
ASSOCIADO A POVOAMENTOS FLORESTAIS EXÓTICOS NO BIOMA PAMPA,
BRASIL

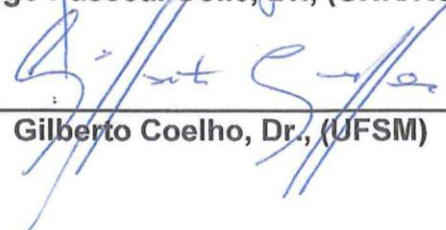
elaborada por
Daiane Fiuza Montagner

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia

COMISSÃO EXAMINADORA


Zaida Inês Antonioli, PhD., (UFSM)
(Presidente / Orientadora)


Diego Pascoal Golle, Dr., (UNICRUZ)


Gilberto Coelho, Dr., (UFSM)

Santa Maria, 10 de março de 2014

***À minha família, pela compreensão, amor e carinho.
Ao meu namorado, pela ajuda, incentivo e paciência.***

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Zaida Inês Antonioli por ter aceitado me orientar durante o mestrado e confiado na realização desse trabalho. Muito obrigada! Pelo apoio e incentivo. Ao prof. Rodrigo pela orientação na condução das atividades no laboratório, apoio e disponibilidade.

À Prof^a. Andressa de Oliveira Silveira, pela orientação, paciência, pelos ensinamentos de biologia molecular, também por me ensinar como escrever cientificamente, MUITO OBRIGADA!!!.

Ao Prof. Gilberto Coelho por ser meu mentor na parte de taxonomia de fungos, pela paciência, disponibilidade e por ensinar a ser detalhista em relação as descrições. Ah! Estava esquecendo, e por ser advogado do Diabo. 😊

Aos pesquisadores Eduardo Nouhra, Marcelo Sulzbacher, Vagner Cortez, Ademir Giachinii, por me ajudar nas diversas dúvidas referentes à taxonomia.

Aos companheiros de laboratório, com quem dividi frustrações e alegrias! Em especial a Manoeli, Afnan, Sabrina e Cristiane. Agradeço a minha querida Dai, pelo companheirismo, amizade e pela ajuda, e também por ouvir minhas lamentações (coitada da Dai!) durante esta jornada. Ao meu amigo do coração Antônio, pelo carinho, amizade e companheirismo.

Agradeço as minhas amigas por sempre estarem comigo, me dando apoio, compartilhando de alegrias e tristezas, em especial pela amizade. Obrigada! Suzy, Andressa, Joana e Kamila 😊. Um agradecimento a minha querida Taciane, se não fosse o incentivo e ajuda dela, não estaria cursando mestrado.

Em especial agradeço ao Neto, meu namorado, que me aturou, teve paciência e me mostrou como agir nas situações difíceis. MUITO OBRIGADA, QUERIDO!

Agradeço a minha família, meus pais por acreditar em mim, aos meus irmãos (Junior e Fernando) e minha irmã Marta, pelo incentivo e por não deixar eu nunca desistir.

Ao meu primo Álvaro por proporcionar momentos de alegria. As minhas tias queridas que amo muito (Neli e Cleci) por sempre estar ao meu lado, me apoiando e ouvido minhas choradeira.

À princesinha da família, Anna Caroline (minha afilhada), por trazer muita alegria e união.

À minha prima Márcia pelas correções de português, referente ao pré-projeto de mestrado.

E por fim, agradeço aos demais e ao Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia da UFSM e a CAPES por ter concedido a bolsa de mestrado.



RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia
Universidade Federal de Santa Maria

CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO *SCLERODERMA* (BASIDIOMYCOTINA) ASSOCIADO A POVOAMENTOS FLORESTAIS EXÓTICOS NO BIOMA PAMPA, BRASIL

AUTORA: Daiane Fiuza Montagner

ORIENTADORA: Zaida Inês Antonioli

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de março de 2014.

O gênero *Scleroderma* Pers.: Fr. pertence à Ordem Boletales, Filo Basidiomycota, e envolve um grupo de fungos cuja produção dos esporos ocorre em um himênio fechado, com liberação passiva dos basidiósporos. As principais características morfológicas deste gênero são o tamanho e ornamentação dos esporos e a associação micorrízica com várias espécies arbóreas. Este trabalho tem por objetivo buscar a identificação das espécies do gênero *Scleroderma* de ocorrência no bioma Pampa, utilizando, para esta finalidade, técnicas morfológicas e de moleculares, segundo metodologias específicas para o estudo do grupo. Para a análise inequívoca da ornamentação dos basidiósporos, foi utilizada a Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV. Os espécimes coletados foram depositados no Herbário SMDB do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM. Para a análise das relações filogenéticas das espécies selecionadas de *Scleroderma*, foram sequenciadas as regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de alguns espécimes coletados ou obtidos de outros herbários para comparação com sequências depositadas no GenBank. Duas espécies foram identificadas: *S. albidum*; *S. citrinum* e um espécime a nível somente de gênero (*Scleroderma* sp.). Foram obtidas 20 novas sequências de ITS, a maioria delas agrupando-se no clado para *S. albidum* contrapondo a variação morfológica inicialmente verificada nos basidiomas e representando os primeiros registros desta espécie para a região ITS no banco de dados do GenBank; as sequências deste clado também apresentaram alta similaridade com outras do GenBank nominadas como *S. bovista*, *S. aurantium* e *Scleroderma* sp. (da Estônia e Montenegro), permitindo, assim, a retificação nas suas identidades para *S. albidum*, *S. citrinum* alinhando com sequências homônimas

da China, Estados Unidos e Alemanha mostrando-se conspecíficas, e seus basidiomas podem ser considerados os de mais fácil identificação da área de estudo pelas suas características morfológicas. O espécime ICN:154625, nominado como *S. verrucosum*, anteriormente citado para o Rio Grande do Sul, mostrou alta similaridade com sequências de *S. areolatum* do GenBank, formando um clado *S. areolatum*. A análise filogenética confirma a tendência na literatura para a formação de dois grandes clados infragenéricos combinando, respectivamente, esporos reticulados e hifas fíbuladas ou esporos equinulados e septos simples. *Scleroderma* sp. isolou-se filogeneticamente dos dois grupos anteriores sugerindo a provável formação de um novo clado combinando com esporos equinulados e hifas fíbuladas.

Palavras-chave: Basidiomycota. Basidiomicetes. Análise molecular. Região ITS. Sistemática.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Agrobiologia
Federal University of Santa Maria

CHARACTERIZATION OF THE GENUS *SCLERODERMA* (BASIDIOMYCOTINA) ASSOCIATED TO EXOTIC FORESTS IN PAMPA BIOME, BRAZIL.

AUTHOR: DAIANE FIUZA MONTAGNER

ADVISOR: ZAIDA INÊS ANTONIOLLI

Date and Local of the Defense: Santa Maria, march 10th 2014.

The genus *Scleroderma* Pers.: Fr. belongs to Order Boletales, Phylum Basidiomycota, and involves a group of fungi whose spore production occurs in an enclosed hymenium with passive basidiospores release. The main morphological characteristic of this genus are the size and ornamentation of the spores and mycorrhizal association with various tree species. The aim of this study is to identify *Scleroderma* species of Pampa biome region by using techniques of morphological analysis and molecular biology following specific methodologies. For an accurate analysis of the basidiospore ornamentation, scanning electron microscopy (SEM) was used. The specimens collected were deposited in the Herbarium SMDB of the Department of Biology, Federal University of Santa Maria - UFSM. For the analysis of phylogenetic relationships of selected species of *Scleroderma* was sequenced the rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) region of some specimens collected or obtained from other herbaria for comparison with sequences deposited in GenBank. Two species were identified: *S. albidum*; *S. citrinum* and a specimen to genus level (*Scleroderma* sp.). We have generate 20 new ITS sequences, clustering most of them, in *S. albidum* clade, contrasting, however, with basidiome morphological variation initially observed; they represent the first records of this species for the ITS region in GenBank database. Sequences in clade *S. albidum* showed high similarity with some other nominated as *S. bovista*, *S. aurantium* and *Sceroderma* sp. from GenBank – so, the latter sequences are considered as conspecific in the clade. *S. citrinum* clustered together with homonymous sequences from China, United States and Germany being conspedifics, and its basidiomes were the most identifiable in study area by their morphological characteristics. The specimen ICN:154625, from Rio

Grande do Sul, State nominated as *S. verrucosum*, showed high similarity with sequences of *S. areolatum* and were identified under the latter name. The phylogenetic analysis confirms the literature trend on formation of two major infrageneric clades combining, respectively, echinulate spores plus simple-septate hyphae and reticulate spores plus fibulae. *Scleroderma* sp. appeared phylogenetically isolated from these two main clusters suggesting a probable formation of a new clade combining echinulate spores and fibulae.

Keywords: Basidiomycota. Basidiomycetes. Molecular analysis. ITS region. Systematics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Bioma Pampa.....	15
2.2 Fungos ectomicorrízicos.....	16
2.3 O gênero <i>Scleroderma</i> Persoon.....	17
3 METODOLOGIA	23
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
5 CAPÍTULO 1 - MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ANALYSES IN SCLERODERMA (BASIDIOMYCOTINA) ASSOCIATED TO EXOTIC FORESTS IN PAMPA BIOME, SOUTHERN BRAZIL.	32
5.1 Abstract	32
5.2 Introduction.....	31
5.3 Materials and methods	34
5.4 Results and discussion.....	37
5.4.1 Taxonomic description.....	37
5.4.2 Phylogenetic analysis	37
5.5 Literature Cited.....	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50

1. INTRODUÇÃO

O bioma Pampa compreende uma área fisionomicamente comum aos países do extremo sul da América do Sul, tais como: Argentina, Uruguai e Brasil. Esse bioma distribui-se predominantemente na metade sul do estado do Rio Grande do Sul e em algumas áreas ao Norte, sendo restrito no Brasil, a este único Estado. É um ecossistema formado por campos ondulados, geralmente de baixa altitude, entrecortados por rios com matas ciliares e com vocação histórica para ação antrópica, tanto por suas comunidades indígenas originais quanto pelas contemporâneas. O estímulo às atividades econômicas nessa região propiciou significativa alteração quanto ao uso da terra, modificando sua biodiversidade.

A opção econômica pelas monoculturas florestais exóticas em detrimento do uso sustentável da terra, mais apropriado à biodiversidade nativa, tem se intensificado na região apesar das discussões sobre os possíveis impactos negativos desta atividade. Frente a esta realidade, destaca-se a necessidade do conhecimento da biodiversidade em geral, incluindo a comunidade microbiana, pois é responsável, em última análise, pela formação e manutenção da estrutura do solo. Destacam-se, dentre estes organismos, os fungos ectomicorrízicos capazes de formar associações simbióticas com as raízes das plantas, ligadas à melhoria do fluxo de nutrientes e água, auxiliando nos ciclos biogeoquímicos.

Os fungos do gênero *Scleroderma* Pers. Fr., são caracterizado pela forma de desenvolvimento do seu basidioma (gasteróides) e pelas características da superfície do perídio, além do tipo de deiscência, coloração da gleba e ornamentação dos basidiósporos, uma das estruturas de maior importância taxonômica para o gênero. Estes fungos estão agrupados na família Sclerodermataceae Corda, ordem Boletales E,-J-Gilbert, classe Agaricomycetes Doweld, subclasse Agaricomycetidae Parmasto e Filo Basidiomycota Whittaker ex Moore. Este grupo de fungos são cosmopolitas e se desenvolvem em todas as regiões temperadas do mundo, formando associação ectomicorrízica com uma grande variedade de plantas.

Considerando a ampla diversidade de espécies vegetais e animais nesta região do Pampa, ainda são poucos os estudos que exploram a riqueza de fungos formadores de ectomicorrizas, ou mesmo de fungos em geral, já que as estimativas

apontam à existência de cerca de 5,1 milhões de espécies de fungos em geral no planeta terra (BLACKWELL, 2011), no entanto, apenas cerca de 80 a 120 mil espécies foram descritas até o presente momento (WEBSTER; WEBSTER, 2007). Os estudos taxonômicos e moleculares na região do bioma Pampa, tornam-se necessários principalmente porque os sistemas agroflorestais envolvem a introdução de espécies florestais exóticas juntamente com diversas espécies de fungos ectomicorrízicos, também introduzidos. Esta realidade requer um maior conhecimento no manejo de todas estas espécies simbiotes em conjunto. *Scleroderma* é um dos gêneros de fungos ectomicorrízicos mais adaptados e disseminados em associação a povoamentos florestais exóticos (NOUHRA et al., 2012).

Este trabalho tem por objetivo aprimorar a identificação de espécies de *Scleroderma* Pers. Fr. da região do bioma Pampa utilizando o estudo morfológico aliado às técnicas de biologia molecular, a fim de permitir estudos futuros de manejo florestal relacionando as espécies micorrízicas mais adequadas às respectivas espécies florestais e suas condições de cultivo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioma Pampa

O estado do Rio Grande do Sul abrange dois tipos de biomas, sendo o Bioma Mata Atlântica localizada ao norte e o bioma Pampa à metade Sul. Este último, reconhecido oficialmente em 2004 como um dos seis biomas brasileiros, restrito ao estado do Rio Grande do Sul, compreende uma extensão territorial de 176.469 km²; cuja porcentagem é equivalente a 2,07% referente ao território brasileiro e 64% do território estadual. Compartilha características fisionômicas com áreas da Argentina e Uruguai (IBGE, 2004; BOLDRINI et al., 2010).

Segundo Boldrini et al. (2010), o Bioma pampa é formado por inúmeras classes de solo característicos da região, podendo variar quanto à distância entre um e outro. São eles: Neossolos, Latossolos, Gleissolos, Planossolos, Argissolos, Vertissolos e Chernossolos. Já o relevo deste bioma é ondulado contendo suaves elevações (SUERTEGARAY, 1998).

A economia do bioma Pampa é baseada no cultivo de arroz, soja e na pecuária, com a criação de 13 milhões de cabeças de gado e 5 milhões de ovelhas por ano, os quais utilizam a pastagem da região (95%) como fonte de forragem. Com a pequena expansão de culturas nesta região, o governo do estado do Rio Grande do Sul, em associação com o projeto PROFLORE – programa de financiamento florestal gaúcho incentivou a implantação de sistema de silvicultura como uma alternativa de renda para os produtores. Essa inserção econômica de povoamentos florestais tem por finalidade a produção de celulose em grande escala (BOLDRINI, 1997; SALLABERRY, 2009).

Este bioma abriga uma grande biodiversidade, onde há aproximadamente três mil espécies vegetais, 385 espécies de pássaros e cerca de 90 espécies de mamíferos terrestres (BOLDRINI, 1997; BILENCA; MIÑARRO, 2004; SANTOS; SILVA, 2011). Contudo, há uma grande escassez de trabalhos no Pampa sobre a diversidade de microorganismos. Os poucos trabalhos realizados foram: Sulzbacher (2010), Lupatini (2012, 2013a, 2013b), Baldoni (2012). Assim como, projetos sobre a

microbiota do bioma Pampa: - Prof. Valerio de Patta Pilar “Rede de Pesquisa em Biodiversidade dos Campos Sulinos” (2013); - Prof. Luiz Fernando Wurdig Roesch “Efeito do cultivo do eucalipto na diversidade de bactérias do solo na região do Pampa Gaúcho”; “Degradação ambiental e qualidade do solo do bioma Pampa determinadas pela diversidade microbiana” (2010); - Prof^a. Zaida Inês Antonioli; - Prof. Rodrigo Jacques “Caracterização morfológica e molecular de fungos ectomicorrízicos hipógeos em plantações de eucalipto no Bioma Pampa” (2011). Dentre os microrganismos presentes no solo destacam-se os fungos micorrízicos, que desempenham importante papel nos ecossistemas florestais, contribuindo para o aumento na absorção de água e nutrientes pelas plantas nesse ambiente.

2.2 Fungos ectomicorrízicos - ECM

As micorrizas são associações mutualísticas entre fungos e as raízes das plantas (BRUNDRETT et al., 1996; PETERSON et al., 2004). Acredita-se que a associação simbiótica entre certas espécies de fungos e as raízes dos vegetais seja abundante, estando presente em uma faixa de 75 a 80% das plantas (SMITH; READ, 1997). Dados da década de 70 e 80 (PYROZYNSKY; MALLOCH, 1975; PIROZYNSKY, 1981) já reconheciam a importância das micorrizas como um fator essencial para a colonização do ambiente terrestre pelas plantas. De acordo com Brundrett et al. (1996), as associações micorrízicas podem ser classificadas em sete tipos: a) micorrizas arbúsculo-vesiculares (MAV) – também chamadas de micorrizas arbusculares (MA); b) ectomicorrizas (ECM); c) ectendomicorrizas; d) orquidóides; e) ericóides; f) monotropóides; e g) arbutóides.

Nas ectomicorrizas, há uma série de características e etapas que definem esses organismos. As hifas penetram intercelularmente nas raízes da planta formando a rede de Hartig, o tecido fúngico faz o revestimento em torno das raízes, denominado de manto fúngico. A maior parte dos fungos ectomicorrízicos pertence aos filos Basidiomycota e Ascomycota. Estes fungos podem formar suas estruturas reprodutivas abaixo da superfície do solo, (fungos hipógeos), ou acima da superfície do solo (fungos epígeos), Figura 1 - (NARA; HOGETSU, 2004; WANG; QIU, 2006; SIQUEIRA et al., 2010).

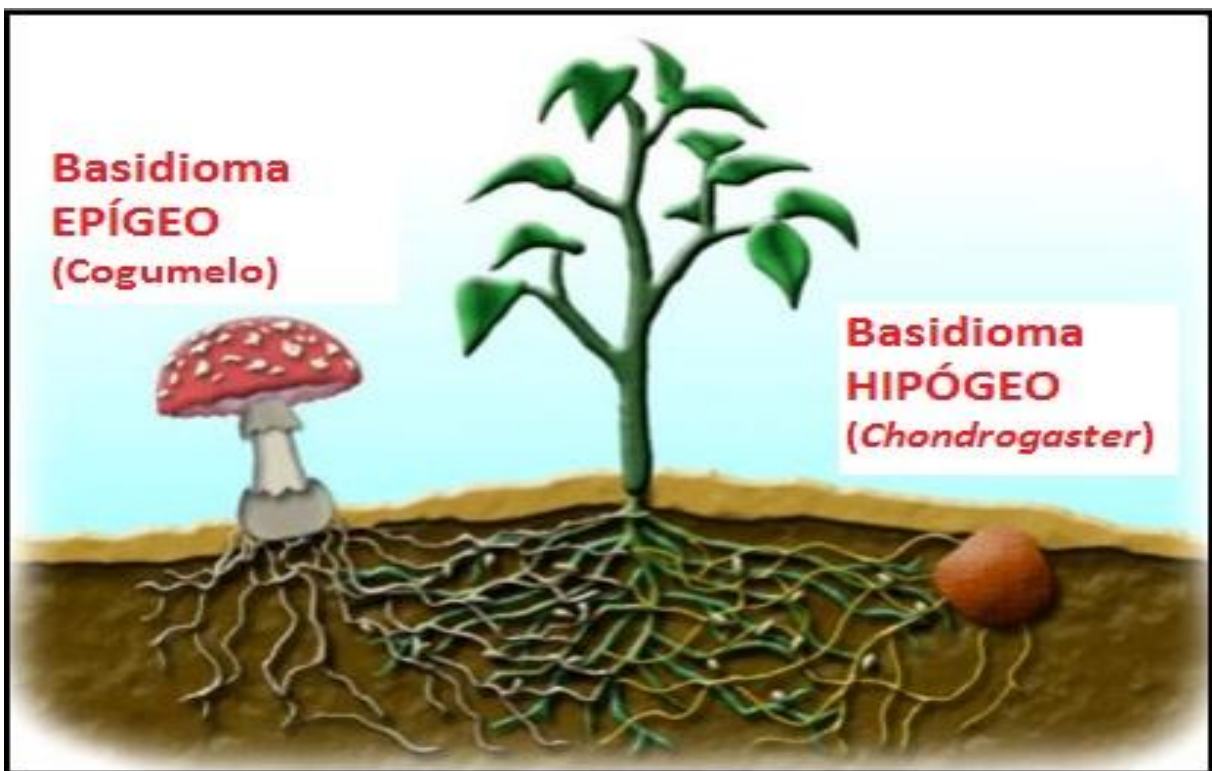


FIGURA 1 - Associação mutualística ectomicorrízica entre planta e fungos de hábito epígeo e hipógeo. Fonte: adaptado BRUNDRETT et al., 1966.

Dentre os gêneros de fungos ectomicorrízicos podemos citar *Hysterangium*, *Pisolithus*, *Rhizopogon* e *Scleroderma*, que associam-se com espécies vegetais pertencentes às famílias Fabaceae, Fagaceae, Myrtaceae e Pinaceae (CAIRNEY; CHAMBERS, 2008; WEBSTER; WEBER, 2007). Estes grupos gasteróides de fungos abrangem distintas características morfológicas que os classificam taxonomicamente, sendo informalmente denominados gasteromicetos.

O termo Gasteromycetes representa uma classe obsoleta segundo a classificação de Martin. Derivado do grego “*gaster*”, que significa estômago, e “*mycetes*” que significa fungos. O prefixo “*gastero*” se refere ao processo de desenvolvimento e maturação dos esporos que ocorre dentro do basidioma (gleba) e estes estão protegidos pelo menos na imaturidade por uma camada externa estéril denominada perídio (DEMOULIN, 1969).

No Brasil, os fungos gasteróides compreendem 232 espécies, distribuindo-se em 54 gêneros e 16 famílias (TRIERVEILER; BASEIA 2009). Na última década, foram realizados estudos mais detalhados e novas espécies foram citadas para o território brasileiro (BASEIA; MILANEZ, 2000, 2001a, 2001b, 2001c, 2002a, 2002b, 2002c, 2003a, BASEIA et al., 2003; BASEIA; CALONGE, 2006, FAZOLINO et al., 2008; GURGEL et al., 2008; TRIERVEILER-PEREIRA; BASEIA et al., 2009; TRIERVEILER-PEREIRA et al., 2013; SILVA et al., 2013). Para região Sul do país, estudos recentes foram publicados por diversos pesquisadores, como: Giachini et al., 2000; Cortez et al., 2008a, Cortez et al., 2008b; Trierviler-Pereira et al., 2009; Loguercio-Leite et al., 2009; Cortez et al., 2011; Cortez et al., 2013; Sulzbacher et al., 2013; Trierviler-Pereira et al., 2013; Cabral et al., 2014.

Dentre os gasteromicetos, o gênero *Scleroderma* é um dos mais adaptados e generalistas dos grupos de fungos associados a povoamentos florestais exóticos (NOUHRA et al., 2012). A evolução na Subordem Sclerodermatineae, um grupo monofilético em Boletales, segue a história biogeográfica de disjunção de plantas. Os estudos indicam que distribuições geográficas amplas são observadas naquelas espécies de Sclerodermatineae com limites mais amplos de hospedeiros, enquanto aquelas com distribuição relativamente limitada tem poucas associações ectomicorrízicas documentadas, sugerindo que generalistas ectomicorrízicos tem maior capacidade de dispersão do que os especialistas.

2.3 O gênero *Scleroderma* Persoon

O gênero pertence à família *Sclerodermataceae* Fr. emend. Guzmán (1970). De acordo com a etimologia, o termo “*Scleroderma*” vem do grego *Skleròs* (duro) e *derma* (pele), “pele dura”. O grupo está classificado na seguinte posição sistemática (MycoBank, 2014):

Reino: Fungi

Filo: Basidiomycota

Subfilo: Agaricomycotina

Classe: Agaricomycetes

Subclasse: Agaricomycetidae

Ordem: Boletales

Subordem: Sclerodermatineae

Família: Sclerodermataceae

Gênero: *Scleroderma*

As espécies do gênero *Scleroderma* são identificadas pelas características do basidioma e da basidiósporos. O basidioma pode ser globoso, subgloboso, com presença ou ausência de escamas ou escâmulas. O perídio, que é a camada externa que circunda a superfície do basidioma, pode ser de espessura fina (ex: *Scleroderma verrucosum*) ou espessa (ex: *Scleroderma citrinum*). Já a gleba, que é considerada como a porção fértil dos fungos, é formada por uma massa de esporos. Quando o basidioma está na fase imatura essa massa de esporos apresenta uma textura compacta, transformando-se numa massa pulverulenta na maturidade (Figura 2). A gleba apresenta coloração variada, dependendo do seu estágio de desenvolvimento (GUZMÁN, 1970; MILLER; MILLER, 1988; ALEXOPOULOS et al., 1996). As rizomorfas são semelhantes às raízes das plantas, porém são formadas de hifas lineares que se dispõem paralelamente uma sobre as outras (KIRK et al., 2008).

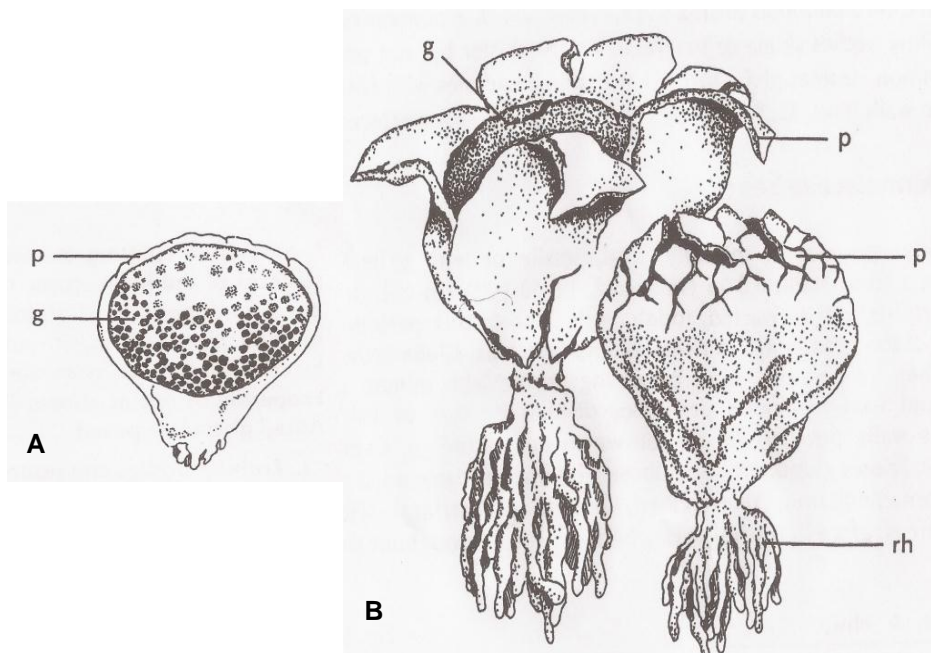


FIGURA 2 - A) Corte transversal do basidioma imaturo de *Scleroderma*: (p) perídio; (g) gleba. B) basidioma maduro de *Scleroderma polyrhizum*: (g) gleba (p) perídio (rh) rizomorfos. Fonte: MILLER & MILLER, 1988.

As características microscópicas são de fundamental importância na identificação das espécies destes fungos. Estruturas como basídios, esporos, hifas, são utilizadas para a classificação das espécies de *Scleroderma*. Os basídios são os responsáveis pela produção dos esporos e sua forma é piriforme, onde em média desenvolvem de dois a três esporos por basídios. Os basidiósporos são a parte reprodutiva do fungo, sua forma é globosa e raramente subglobosa. Segundo Guzmán (1970), o estágio de desenvolvimento dos basidiósporos de *Scleroderma*, ocorre da seguinte forma (Figura 3): i) a partir dos basídios há liberação dos esporos, esses de coloração hialina, superfície lisa e parede grossa; ii) no estágio de maturação as hifas e as células nutritivas da trama rodeiam os esporos, desenvolvendo uma superfície ornamentada e de tamanho maior; essas características dos esporos variam de acordo com o tipo de espécies, podendo ser iii) *equinulada* (esporos coberto de espinhos), iv) *reticulada* (esporo formado, por uma rede) e v) *subreticulada* (retículo pouco desenvolvido).

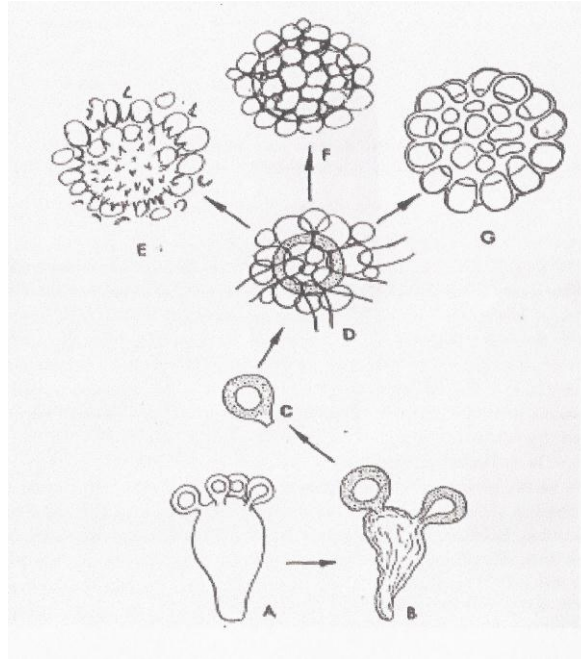


FIGURA 3 - Estágio de desenvolvimento dos esporos de *Scleroderma*. A) basídio juvenil, composto de quatro basidiósporos jovens; B) basídio em fase de degeneração; C) esporos liberado do basídio; D) esporo rodeado de hifas e células nutritivas; E) esporo equinulado; F) esporo subreticulado; G) esporo reticulados. Fonte: GUZMÁN, 1970.

Segundo Guzmán (1970), com base na estrutura desses esporos, o gênero pode ser dividido em três seções: *Aculeatispora* (basidiósporos equinulado); *Sclerangium* (basidiósporos subreticulado) e *Scleroderma* (basidiósporos reticulado). Devido à diferença da estrutura de ornamentação dos esporos é essencial analisá-los em MEV (microscopia eletrônica de varredura), garantindo melhor visualização e identificação das espécies (Figura 4).

A estrutura microscópica do perídio é de essencial importância para a caracterização taxonômica das espécies. Podendo ser dividido em duas ou três camadas. Quando as duas camadas estão presentes são chamadas de exoperídio (a mais externa) e endoperídio (a mais interna), e quando as três estão presentes a camada mediana é denominada mesoperídio (MILLER & MILLER, 1988). As estruturas destas camadas são constituídas de hifas com presença ou ausência de fíbula (GUZMÁN, 1970), pigmentada, hialina, de espessura grossa ou fina e de parede espessa ou fina, também apresentam estruturas pseudoparenquimatosa (estrutura em formato celular).

As relações filogenéticas destes fungos não estão bem esclarecidas, devido à falta de informações moleculares e também de caráter taxonômico. Os poucos estudos que envolvem filogenia e taxonomia sobre o gênero *Scleroderma*, confirmam a relação evolutiva das espécies de acordo com o desenvolvimento da ornamentação dos esporos, proposto por Guzmán (1969). Porém, contradiz a relação do tamanho dos esporos, como fator determinante na identificação das espécies. Kumla et al (2013) evidencia a similaridade dos tamanho dos esporos das espécies de *S. dictyosporum*, *S. meridionales*, *S. septentrionale*, sendo que ambos tem a mesma ornamentação dos esporos (reticulado). Nouhra et al (2012) afirma que fatores como variabilidade intra-específica e a similaridade interespecífica observada na ornamentação dos esporos, podem induzir muitas vezes a determinação errônea de uma espécies, como acontece com alguma espécies crípticas (morfologicamente iguais e geneticamente diferentes).

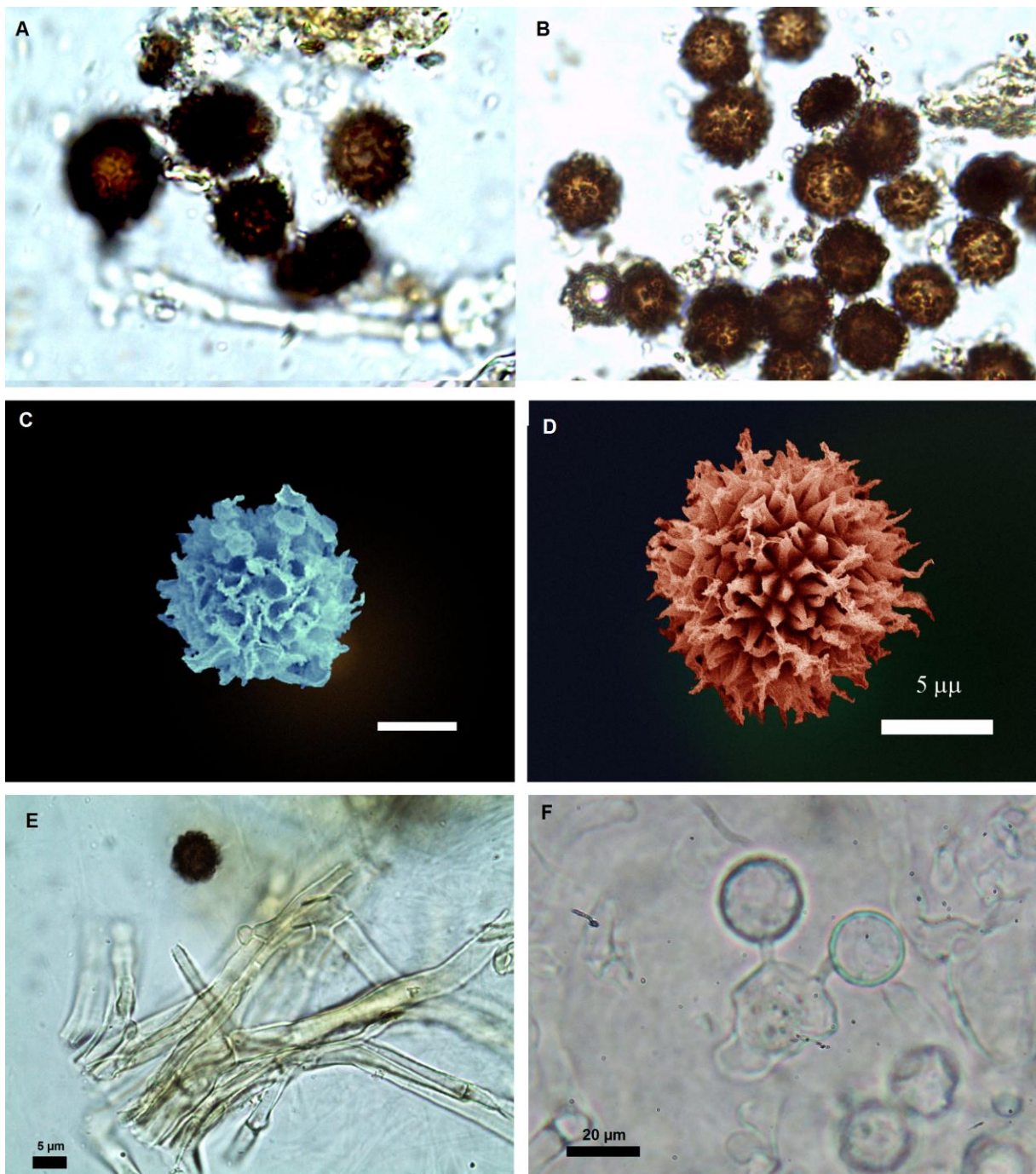


FIGURA 4 - Microestruturas de *Scleroderma*: a) esporo reticulado. b) esporo equinulado c) esporo reticulado MEV. d) esporo equinulado MEV. e) hifas exoperídio, com presença de fíbula. f) basídio de *S. citrinum*. Fonte: MONTAGNER, F. D; COELHO, G (2014).

Cerca de 30 espécies de *Scleroderma* são reportadas mundialmente. No Brasil são 13 espécies (GUZMÁN, 1970; GUZMÁN; OVREBO; 2000; BASEIA; MILANEZ, 2000; GIACHINI et al., 2000; MEIJER, 2001; 2006; GURGEL et al., 2008;

SANON et al., 2009; CORTEZ et al., 2011). Na região Sul do Brasil, Sulzbacher et al. (2013) citam a ocorrência de 12 espécies. Já para o estado do Rio Grande do Sul, tendo como destaque a obra intitulada "*Gasteroid Mycobiota of Rio Grande do Sul, Brazil: Boletales*", Cortez et al. (2011) registram sete espécies de fungos do gênero *Scleroderma*, sendo eles: *S. albidum* Pat. and Trab. Emend. Guzmán, *S. bovista* Fr., *S. citrinum* Pers., Syn., *S. dictyosporum* Pat., Bull, *S. fuscum* (Corda) E. Fisch., *S. leave* Lloyd emend. Guzmán, e *S. verrucosum* (Bull.) Pers. No entanto, são incipiente os estudos utilizando técnicas de biologia molecular em relação a esse gênero no Brasil.

Alguns gêneros de fungos estudados filogeneticamente trazem vários nomes específicos distribuídos em clados terminais não monofiléticos. No caso de *Scleroderma citrinum* e *S. areolatum* não há formação de grupos de espécies monofiléticos, podendo resultar de identificações errôneas ou até espécies crípticas, como tem sido evidenciadas em outros gêneros de Sclerodermatineae, como *Pisolithus* e *Astraeus* (WILSON et al., 2012).

É de suma importância a identificação desses fungos, pois a sistemática deste grupo não é bem esclarecida, tornando-se necessários mais estudos de caráter molecular, para melhor compreensão das relações filogenéticas dessas espécies. Bem como, em estudos biotecnológicos, com ênfase na produção de fármacos, no mecanismo de absorção de elementos traços.

3 METODOLOGIA

A metodologia geral utilizada para realização deste estudo é apresentada de forma detalhada no artigo 1 e de forma esquemática como segue (Figura 5):

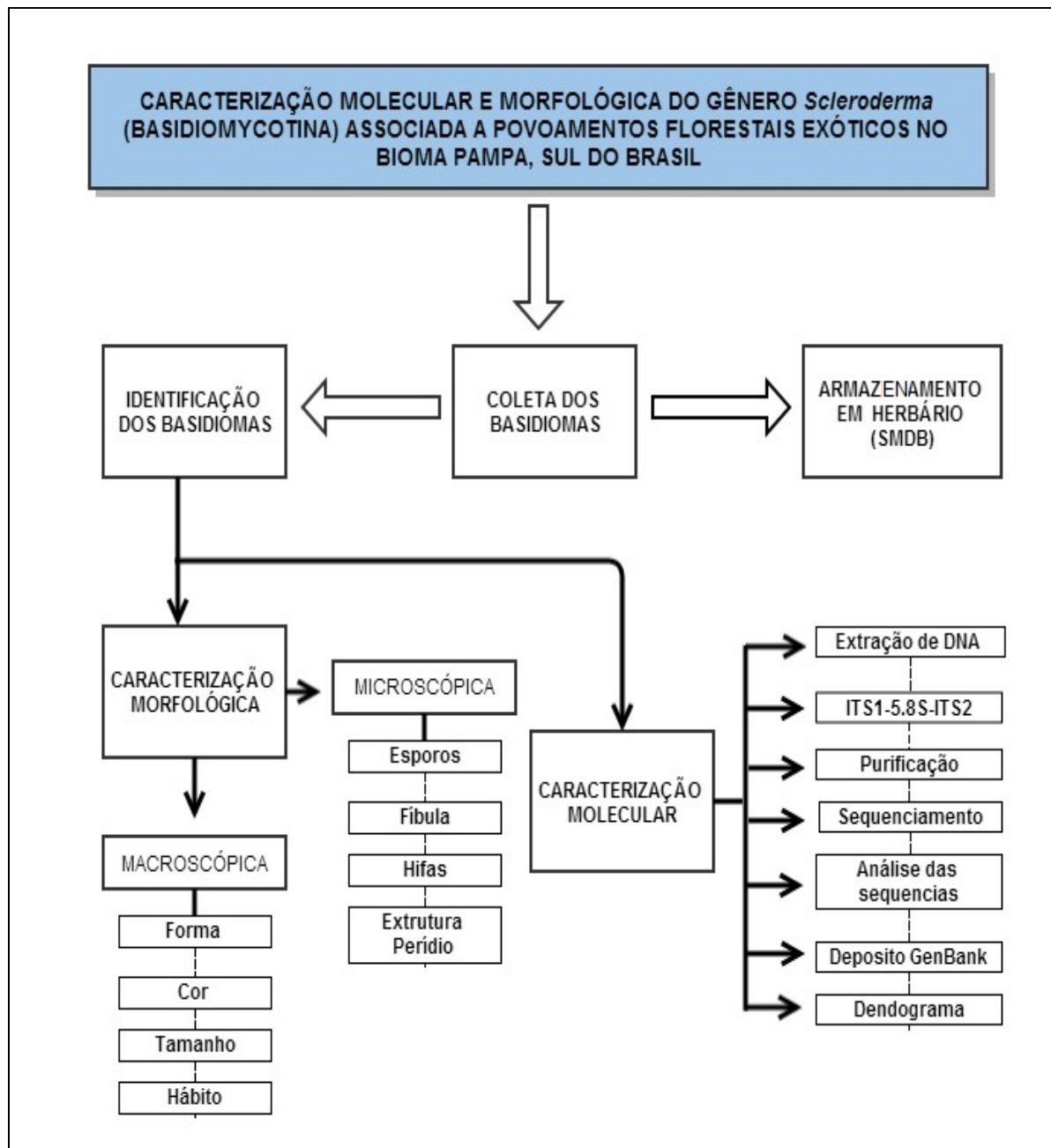


FIGURA 5 – Esquema metodológico do estudo do gênero *Scleroderma* no bioma Pampa, no Rio Grande do Sul – RS. Fonte: MONTAGNER, F. M (2014).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C. J; MIMS, C. W; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed. Wiley, New York, 1996.

BALDONI, D. B. **Ocorrência de *Pseudomerulius curtisii*, *Gelatoporia subvermispora* e *Sacporia polyspora* no Sul do Brasil**. 2012. 51 f. Dissertação (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

BASEIA, G. I; MILANEZ, A. I. First record of *Scleroderma polyrhizum* Pers. (Gasteromycetes) from Brazil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 14, n. 2, p. 181-184, 2000.

BASEIA I. G; MILANEZ A. I. *Crucibulum leave* (Huds.) Kambly in cerrado vegetation of São Paulo State, Brazil. **Acta Botanica Brasílica**, v. 15, n. 1, p. 13–16, 2001.

BASEIA I. G; MILANEZ A. I. *Nidularia pulvinata* (Schwein.) Fr. (Gasteromycetes): a new record from Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 4, p. 479-481, 2001b.

BASEIA I. G; MILANEZ A. I. *Montagnea houssknechtii* (Podaxales), a rare agaricoid fungus: first record from Brazil. **Acta Botanica Brasília**, v. 16, n. 3, p. 311–315, 2002c.

BASEIA I. G; MILANEZ A. I. *Rhizopogon* (Gasteromycetes): hypogeous fungi in exotic forests from the State of São Paulo, Brazil. **Acta Botanica Brasília**, v. 16, n. 1, p. 55–60, 2002b.

BASEIA I. G; MILANEZ A. I. *Tulostoma* (Gasteromycetes) from the cerrado region, State of São Paulo, Brazil. **Acta Botanica Brasília**, v. 16: n. 1, p. 9–14, 2002a.

BASEIA I. G; MILANEZ A. I. *Cyathus* (Gasteromycetes) in areas of the Brazilian cerrado region, São Paulo State. **Mycotaxon**, n. 80, p. 493-502, 2003a.

BASEIA I. G; GIBERTONI, T. B; MAIA, L. C. *Phallus pygmaeus*, a minute species from a brazilian tropical rain forest. **Mycotaxon**, n. 85: p. 77-80, 2003.

BASEIA, I. G, CALONGE, F. D. *Geastrum hirsutum*: a new earthstar fungus with a hairy exoperidium. **Mycotaxon**, n. 95, p. 301-304, 2006.

BILENCA, D; MIÑARRO, F. Identificación de áreas valiosas de pastizal en las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y Sur de Brasil. **Fundación Vida Silvestre**, 2004.

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

BOLDRINI, I. I. Campos no Rio Grande do Sul. Fisionomia e problemática ocupacional. **Boletim do Instituto Central de Biociências**, v. 56, n. 1, p. 1-39, 1997.

BOLDRINI, I. L; FERREIRA, P. M. A; ANDRADE, B. O et al. **Bioma Pampa: diversidade florística e fisionômica**. Editora Pallotti, Porto Alegre, p. 12-13, 2010.

BRUNDRETT M, BOUGHER N, DELL B, GROVE T, MALAJCZUK N. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. *ACIAR monograph* 32. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, 1996.

CABRAL, T. S; SILVA, B. D. B; MARINHO, P; BASEIA, I. G. *Geastrum rusticum* (*Geastraceae*, Basidiomycota), a new earthstar fungus in the Brazilian Atlantic rainforest - a molecular analysis. **Nova Hedwigia**, v. 98, p. 265-272, 2014.

CAIRNEY, J. W. G; CHAMBERS, S. M. Ectomycorrhizal fungi: key genera in Dictionary of the Fungi, 10th ed. **CAB Publishing**, 655p. 2008,

CORTEZ, V. G; BASEIA, I. G; SILVEIRA, R. M. B. Gasteromicetes (*Basidiomycota*) no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 3, p. 291-299, 2008a.

CORTEZ, V. G; SULZBACHER, M. A; BASEIA, I. G; SILVEIRA, R. M. B. Two little known gasteroid fungi from Santa Catarina State, southern, Brazil. **Myxotaxon**, n. 106, p. 297-302, 2008b.

CORTEZ, V. G; BASEIA, I. G; SILVEIRA, R. M. B. Gasteroid Mycobiota of Rio Grande do Sul, Brazil: Boletales. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 2, n. 4, p. 44 -52, 2011.

CORTEZ, V. G; BASEIA, I. G; SILVEIRA, R. M. B. Gasteroid mycobiota of Rio Grande do Sul, Brazil: *Lycoperdon* and *Vascellum*. **Mycosphere**, v. 4, p. 745-758, 2013.

DEMOULIN, V. Les gastéromycètes. Introduction a l'étude dès *Gasteromycetes* de Belgique. **Les Naturalists belges**. n. 50, p. 225-270, 1969.

FAZOLINO, E. P; CALONGE, F. D; BASEIA, I. G. *Geastrum entomophilum*, a new earthstar with na unusual spore dispersal strategy. **Mycotaxon**, n. 104, p. 449-453, 2008.

GIACHINI, A. J.. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. **Mycologia**, Corvallis, v. 92, n. 6, p. 1166-1177, 2000.

GIACHINI, A. J; OLIVEIRA, V. L; CASTELLANO, M. A; TRAPPE, J. M.

GURGEL, F. E; SILVEIRA, B. D. B; BASEIA, I. G. New records of *Scleroderma* from northeastern Brazil. **Mycotaxon**, n. 105, p. 399-405, 2008.

GUZMÁN, G. Monografía del género *Scleroderma* Pers. emend. Fr. (Fungi-Basidiomycetes). **Darwiniana**, v. 16:p. 233–407, 1970.

GUZMÁN, G; OVREBO, C. L. **New observations on Sclerodermataceous fungi**. *Mycologia*, v. 92, n. 1, p. 174–179, 2000.

IBGE - Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Mapa dos biomas brasileiros**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomas.shtm>>. Acesso em 22 de jun de 2012.

KIRK, P. M; CANNON, P. F, MINTER, D. W; STALPERS, J. A. – **Dictionary of the Fungi**, CBS (eds), 10th ed, The Netherlands, 2008.

LOGUERCIO-LEITE, C; SANTANA, M. C; GERLACH, A; GUTJAHR, M; TRIERVEILER-PEREIRA, L; DRECHSLER-SANTOS, E. R; BALTAZAR, J. M. Resume of macromycetes from Santa Catarina State, Southern, Brazil. **Insula**, 2009.

LUPATINI, M. **Mudança do uso da terra e tipo de solo são fatores determinantes das comunidades de fungos e arqueas no bioma Pampa**. 2012. 44 f. Dissertação (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

LUPATINI, M; JACQUES, R. J. S; ANTONIOLLI, Z. I et al. Land-use change and soil type are drivers of fungal and archaeal communities in the Pampa biome. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 223-233, 2013a.

LUPATINI, M; SULEIMAN, A. K. A; JACQUES, R. J. S; ANTONIOLLI, Z. I et al. Soil-Borne Bacterial Structure and Diversity Does Not Reflect Community Activity in Pampa Biome. **Plos One**, v. 8, p. e76465, 2013b.

MEIJER, A. A. R de. Mycological work in the Brazilian State of Paraná. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 72, n. 1-2, p.105-159, 2001.

MEIJER, A. A. R. de. Preliminary list of the Macromycetes from the Brazilian State of Paraná. **Boletim do Museu Botânico Municipal**, Curitiba, v. 68, p. 01-58, 2006.

MILLER, Jr. O. K; MILLER, H. H; **Gasteromycetes morphological and development features with keys to the orders, families, and genera**. Eureka (USA): Mad River. p. 157, 1988.

NARA, K; HOGETSU, T. Ectomycorrhizal fungi on established shrubs facilitate subsequent seedling establishment of successional plant species. **Ecology**, v. 85, n. 6, p. 1700-1707, 2004.

NOUHRA, E. R; CAFFOT, M. L. H, PASTOR, N; CRESPO, E. M. The species of *Scleroderma* from Argentina, including a new species from the *Nothofagus forest*. **Mycologia**, v. 104, n. 1, p. 488–495, 2012.

PETERSON, R. L et al. **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. Ottawa: NRC Research Press, p. 173, 2004.

PIROZYNSKI, K. A. A interactions between fungi and plants through the ages. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, n. 1, p. 1824 -1827, 1981.

PIROZYNSKI, K. A.; MALLOCH, W. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. **BioSystems**, v.6, n. 1, p. 153 – 164, 1975.

SALLABERRY, D. **Fauna Gaúcha em Perigo**. Disponível em: (<http://www.natbrasil.org.br/>) > Acesso em: 21 de julho de 2009.

SANON, K. B; BÂ, A. M; DELARUELLE, C; DUPONNOIS, R; MATIN, F. Morphological and molecular analyses in *Scleroderma* species associated with some caesalpinoid legumes, *Dipterocarpaceae* and *Phyllanthaceae* trees in southern Burkina Faso. **Mycorrhiza**, v. 19, p. 571–584, 2009.

SANTOS, S.; SILVA, L. G. Remote sensing image mapping evidence Brazilian Pampa biome under threat . **Bol. Geogr. Maringá**, v. 29, n. 2, p. 49-57, 2011.

SILVA, B. D. B; CABRAL, T. S; MARINHO, P; BASEIA, I. G. Two new species of *Geastrum* (*Geastraceae*, Basidiomycota) found in Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 96, p. 445-456, 2013.

SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A.; CARDOSO, E. J. B. N et al. Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil 2006. In: KASUYA, M. C.; COSTA, M. D.; ARAUJO, E. F et al. **Ectomicorrizas no Brasil: biologia e nutrição de plantas**. Lavras: UFLA, 615 p. 2010,

SMITH, S. E; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic press, p. 605, 1997.

SUERTEGARAY, D. M. A. **Deserto Grande do Sul: Controvérsia**. Porto Alegre: UFRGS, p. 130, 1998.

SULZBACHER, M. A. **Fungos Ectomicorrízicos do Sul do Brasil, com ênfase no hábito hipógeo**. 2010, 131 f. Dissertação (Mestrado em ciência do solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

SULZBACHER, M. A; GREBENC, T; JACQUES, R. J. S; ANTONIOLLI, Z. I. Ectomycorrhizal fungi from southern Brazil – a literature-based review, their origin and potential hosts. **Mycosphere**, v. 4, n. 1, p. 61–95, 2013.

TRIERVEILER-PEREIRA, L. BASEIA, I. G. A checklist of the A checklist of the Brazilian gasteroid fungi (*Basidiomycota*). **Mycotaxon**, v. 108: p. 441–444, 2009.

TRIERVEILLER-PEREIRA, L; SANTOS, P. J. P; BASEIA, I. G. Ecological aspects of epigeous gasteromycetes (*Agaricomycetes*, Basidiomycota) in four remnants of the Brazilian Atlantic Forest. **Fungal ecology**, v. 6, p. 471-478, 2013.

WANG, B.; QIU, Y.L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. **Mycorrhiza**. v.16, n.1, p. 299-363, 2006.

WEBSTER, J; WEBSTER, R. W. S. **Introduction to Fungi**. Cambridge University Press, 3 ed. 2007.

WILSON, W. A; BINDER, M; HIBBETT, S. D. Diversity and evolution of ectomycorrhizal host associations in the Sclerodermatineae (Boletales, Basidiomycota). **New Phytologist**, v. 194, p. 1079–1095, 2012.

Capítulo1

Morphological and molecular analyses in *Scleroderma* (Basidiomycotina) associated to exotic forests in Pampa biome, southern Brazil.

Abstract

Mycorrhizal fungi living in symbiosis with arboreal species participate actively in soil dynamics and forest ecology, even in cultivated forests. Several basidiomes of *Scleroderma* were collected on exotic forest soils from southern part of Rio Grande do Sul State, at Pampa Biome, a grassy region found in southern Brazil and adjacent countries. These fungi were studied under morphological and molecular approaches in order to contribute to the knowledge of the species identity and their phylogenetic relationships, still incipient to the genus. Two species were found, namely: *S. albidum*, *S. citrinum* and *Scleroderma* sp. We have generate 20 new ITS rDNA sequences, which were found to form at least 3 clades at specific level either including their conspecific equivalents retrieved from GenBank or solely; tree more clades were nested only with species retrieved from database. Infrageneric dichotomy for reticulate and echinulate spores is herein confirmed by separation in two larger clades, respectively for the combinations of reticulate spores plus fibulate hyphae and echinulate spores plus simple-septate hyphae. *Scleroderma* sp. appeared phylogenetically isolated from these clusters likely suggesting a new clade formation for combining echinulate spores and fibulate hyphae.

Key words: Gasteromycetes, soil symbionts, Phylogenetic analysis

INTRODUCTION

The Pampa bioma is one of six Brazilian biomes, being restricted to Rio Grande do Sul State, Brazil. It is placed on southern part of this State comprehending 176.469 km² in territorial area, 64% of State's territory and 2.07% of Brazilian territory. This biome shares physiognomic characters with Pampean region of Uruguay and Northern Argentina (IBGE, 2004; BOLDRINI et al, 2010). Predominant

vegetation kinds at Pampa Biome are grasses, shrubs and riparian forests. Recent data point to nearly 3 thousand plant species, being some of them endemic to Pampean region (BOLDRINI et al., 2010; IGANCI et al., 2011).

Currently, this region is known to present great cultivated areas with exotic forest species, mainly *Eucalyptus* spp. and *Pinus* spp. Some biodiversity inventory from Pampa biome have revealed a high richness of animal e vegetal species, however, a few are known on microbiological diversity, being still rare especially on ectomycorrhizal diversity associated exotic forest cultures (*Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp.), mainly on fungal genus *Scleroderma* Pers., which species have been recognized by their noticeable forestry and biotechnological potential (MASON et al., 2000; DUÑABEITIA et al., 2004; ORTEGA., 2004; CHEN et al., 2006).

The genus *Scleroderma* Pers. is found in tropical, temperate and subtropical ecosystems worldwide, comprehending around 30 species morphologically recognized, with 13 of them being reported from Brazil (GUZMÁN, 1970; BASEIA & MILANEZ, 2000; GIACHINI et al., 2000; MEIJER, 2006; GURGEL et al., 2008; SANON et al., 2009; CORTEZ et al., 2011). Its diagnostic characters are: basidiome gasteroid of epigeous habit, rarely hypogeous, basidiospores globose to subglobose, with ornamentation reticulate to echinulate (GUZMÁN, 1970; GIACHINI et al., 2000; CORTEZ et al., 2011; YOUSAF et al., 2012; NOUHRA et al., 2012).

Knowledge about the genus *Scleroderma* in Pampa biome is still limited, the main taxonomical work is of Cortez et al. (2011), who identified seven species, being: *S. albidum* Pat. & Trab. Emend. Guzmán, *S. bovista* Fr., *S. citrinum* Pers., *S. dictyosporum* Pat., Bull., *S. fuscum* (Corda) E. Fisch., *S. leave* Lloyd emend. Guzmán, and *S. verrucosum* (Bull.) Pers. However, studies with this genus using molecular approaches are inceptive in Brazil. In the world, this approach has been used more recently in *Scleroderma* and involving only scattered species and a few specimens (PHOSRI et al., 2009; SANON et al., 2009; NOUHRA et al., 2012; KUMLA et al., 2013).

The purpose of this work is to contribute to the identification of *Scleroderma* species from Pampa Biome through morphological and molecular analysis for the advance of studies on mycorrhizal fungi and their plant host cultures. It also will contribute with new molecular data available for subsequent studies in public databases (ITS region) and phylogenetic relationships of *Scleroderma*, which are still incipient in worldwide scientific literature.

MATERIALS AND METHODS

Collection of species - fresh basidiome were found in association with *Eucalyptus* spp. and *Pinus* spp. in the region of Pampa Biome, Rio Grande do Sul State – Brazil (Figura 1), from september 2010 to october 2013. Basidiomes were dried in MARCONI model MA033 dryer 45-50°C. Collected specimens were deposited at SMDB herbarium (Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria).

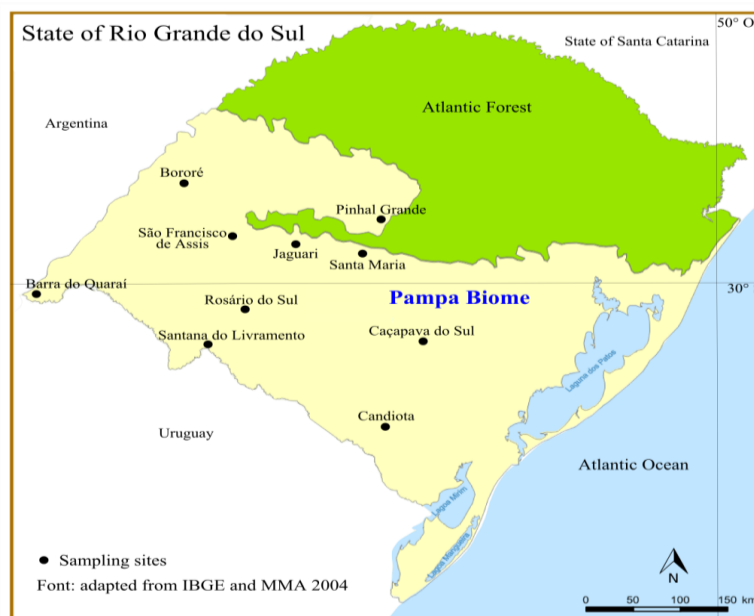


FIGURA 1 - Map of the state of Rio Grande do Sul, showing the region of Pampa biome (yellow) and places of basidiomes collection. Font: IBGE and MMA, 2004.

Identification and description - basidiomes were photographed *in situ* and their macroscopical characters (e. g. collar, size, and form) were observed following Brundrett et al. (1996). Color names were compared and noted according to Munsell Soil Color Charts (2009). Microscopical characters were analyzed in optical microscope model OLYMPUS CX40, from hand made sections with razor blades, and rehydrated in KOH at 3% (v/v). At least 35 measures of each microstructure were obtained; usually including ornamentation for the spores (or not for comparison with

literature). For Scanning Electronic Microscopy (SEM) of spores, herborized specimens were mounted directly on aluminum stubs covered with carbon band and subsequently a layer of gold with 15 nm in thickness, using a Balzers SCD 050 Sputter. Spores were examined in microscope model JEOL – JSM 6060 at Centro de Microscopia Eletrônica – CME, from Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Dychotomous keys to species identification were used from specific bibliography (NOUHRA et al., 2012, CORTEZ et al., 2011, GUZMÁN, 1970, SIMS et al., 1995).

Molecular analysis - for DNA sample, it was removed a fraction of the fresh basidiome for storage in CTAB (GARDES & BRUNS, 1993) at -20° C until the time of the analyzes. DNA was extracted with the DNeasy ® Plant Mini Kit (Qiagen, São Paulo, Brazil) kit. For the extraction of DNA from herbarium specimens, it was used EZNA ® Forensic DNA Extraction Kit (Omega Bio-tek, product No.: D3591-01). The complete region in rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) was amplified with primers ITS1 and ITS4 (White et al., 1990). The amplification reaction of the rDNA fragments was performed according Baldoni et al. (2012). After the PCR amplification, electrophoresis was performed in 1.5% agarose gel and 1X TBE buffer. The DNA samples were stained with BlueGreen Loading Dye I ® (LGC Biotechnology, Cotia, Brazil) and observed under UV light. The PCR products were purified with Gen Elute PCR Clean-up Kit® (Sigma, St. Louis, USA) kit, following the manufacturer's instructions.

Sequencing of the samples was performed into the sequencer, ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequenced fragments were analyzed using the Staden Package 2.0.0b program (STADEN et al., 2003) for obtaining consensus sequences and then, deposited in GenBank and received their access numbers. The sequences have been aligned in Bioedit program. The phylogenetic relationship of the specimens was reconstructed based on analyzes of the ITS region in MEGA 5.0 software (TAMURA et al., 2011), with the analysis of Maximum Likelihood (ML) in a total of 1000 replications for all reconstructions. The model of nucleotide substitution General Time Reversible model was estimated using JModelTest as the best model to solve the data (POSADA et al., 2006), performed with uniform rates and parameters for partial exemption (95%). Selected closely related sequences for phylogenetic analysis of the genus *Scleroderma* were retrieved from the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A total of 53 sequences (Table 1) including the outgroup taxa *Pisolithus tinctorius* (AF374632) and

Pisolithus albus (AF440868) were used for analyses.

TABLE 1 - List of species included in phylogenetic analysis, herbarium number, place of origin, and GenBank access number.

Species	Strain /Specimen	Origin	GenBank
<i>Scleroderma albidum</i> *	ICN: 154608	Santa Maria, RS, Brazil	-
<i>Scleroderma albidum</i> *	UFSM PM02/SMDB: 14.507	Barra do Quaraí, RS, Brazil	-
<i>Scleroderma albidum</i> *	UFSM PM05/SMDB: 14.505	Bororé RS, Brazil	-
<i>Scleroderma albidum</i> *	UFSM PM12/SMDB: 14.503	Bororé RS, Brazil	-
<i>Scleroderma albidum</i> *	UFSM PM12/SMDB: 14.517	Bororé RS, Brazil	-
<i>Scleroderma albidum</i> *	UFSM PM13/SMDB: 14.516	Jaguari RS, Brazil	-
<i>Scleroderma albidum</i> *	UFSM PM23/SMDB: 14.508	Jaguari RS, Brazil	-
<i>Scleroderma albidum</i> *	UFSM/SMDB: 42	Caçapava do Sul, RS, Brazil	-
<i>Scleroderma albidum</i> *	UFSM/SMDB: 55	Rosário do Sul, RS, Brazil	-
<i>Scleroderma albidum</i> *	UFSM PM104/SMDB: 14.512	Santa Maria, RS, Brazil	-
<i>Scleroderma albidum</i> *	UFSM PM109/SMDB: 14.513	Pinhal Grande, RS, Brazil	-
<i>Scleroderma albidum</i> *	UFSM PM112/SMDB: 14.510	Santana do Livramento, RS, Brazil	-
<i>Scleroderma albidum</i> *	UFSM PM117/SMDB: 14.509	Santana do Livramento, RS, Brazil	-
<i>Scleroderma albidum</i> *	UFSM PM118/SMDB: 14.511	Santana do Livramento, RS, Brazil	-
<i>Scleroderma albidum</i> *	UFSM PM142/SMDB: 14.514	São Francisco de Assis, RS, Brazil	-
<i>Scleroderma areolatum</i>	PBM2205	USA	EU718116
<i>Scleroderma areolatum</i>	JMP00080	USA	EU819438
<i>Scleroderma areolatum</i>	RBG Kew K(M)125392	England, USA	EU784407
<i>Scleroderma areolatum</i>	E00278286	Dane County, WI., USA	FM213353
<i>Scleroderma areolatum</i>	F:PGK193	USA	GQ166910
<i>Scleroderma aurantium</i>	8-5	Schuan, China	HM237174
<i>Scleroderma bovista</i>	K(M)105588	England	EU784409
<i>Scleroderma bovista</i>	RT00034	USA	EU819517
<i>Scleroderma bovista</i>	BCN-MPM1989	Catalonia, Spain	FM213340
<i>Scleroderma bovista</i>	5-1	Schuan, China	HM237175
<i>Scleroderma bovista</i>	MG061001_01	Thuringia, Germany	JQ669943
<i>Scleroderma bovista</i>	O1A_1	USA	JX030276
<i>Scleroderma bovista</i>	O1Q_1	USA	JX030277
<i>Scleroderma bovista</i>	Sc1_1-1-2LC	USA	JX030217
<i>Scleroderma bovista</i>	Sc1_1-2-2LC2	USA	JX030218
<i>Scleroderma bovista</i>	-	Japan country	AB099901
<i>Scleroderma bovista</i>	K80S09	New Zealand	GQ267487
<i>Scleroderma bovista</i>	CM9	Pakistan	KF881875
<i>Scleroderma citrinum</i>	YL007	China	FJ687275
<i>Scleroderma citrinum</i>	Sc1_1-3-1H	USA	JX030202
<i>Scleroderma citrinum</i>	Sc1_2-2-1H	USA	JX030205
<i>Scleroderma citrinum</i>	Sc1_2-2-1HC	USA	JX030207
<i>Scleroderma citrinum</i>	CH1-127	USA	JX079368
<i>Scleroderma citrinum</i>	(DNA 778)	Germany	HM189957
<i>Scleroderma citrinum</i>	JMP0082	USA	EU819440
<i>Scleroderma citrinum</i> *	UFSM PM118/SMDB: 14.500	Santa Maria, RS, Brazil	-
<i>Scleroderma citrinum</i> *	UFSM PM139/SMDB: 14.499	Santa Maria, RS, Brazil	-
<i>Scleroderma polyrhizum</i>	Sc1_1-1-4Nc	USA	JX030195
<i>Scleroderma polyrhizum</i>	E00278315	USA	FM213349

TABLE 1 - List of species included in phylogenetic analysis, herbarium number, place of origin, and GenBank access number.

Species	Strain /Specimen	Origin	GenBank
<i>Scleroderma polyrhizum</i>	E00278313	USA	FM213350
<i>Scleroderma verrucosum</i> *	ICN: 154625	Santa Maria, RS, Brazil	-
<i>Scleroderma</i> sp.	P091	Estônia country	FN669245
<i>Scleroderma</i> sp.	5-2	China: Sichuan	HM237172
<i>Scleroderma</i> sp.	ScT-X-08	"Montenegro: Tivat"	JQ685726
<i>Scleroderma</i> sp.*	UFSM/ PM 73	Candiota, RS, Brazil	-
<i>Scleroderma</i> sp.*	UFSM/ PM 74	Candiota, RS, Brazil	-
<i>Pisolithus albus</i>	T25070	Australia	AF440868
<i>Pisolithus tinctorius</i>	MARX270	Geórgia, USA	AF374632

* *Scleroderma* species obtained from Pampa biome / RS

RESULTS AND DISCUSSION

Two species and one to the genus level of *Scleroderma* were identified from specimens either collected on nature or borrowed from personal and institutional herbaria and are herein described. Phylogenetic relationships of their ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequences and others molecularly related and retrieved from GenBank were accessed.

TAXONOMIC DESCRIPTION

Scleroderma albidum Pat. & Trab. Emend. Guzmán, Darwiniana 16: 295, 1970. FIGS. A-B

Macrocharacters - Basidiomata epigeous, 6–39 mm high, 6.7–37 mm in diam., globose to subglobose; surface smooth, cracked, to squamulose, background yellow (8/6–7/6 2.5Y) to brownish yellow (6/6 0YR), cracks small (± 0.5 mm), irregular, olive yellow (6/8 2.5Y) at the top; squamules small, very pale brown (8/3–8/4 10YR) light olive brown (5/6 2.5Y), dark yellow brown (4/4 10YR) in the base Yellow (8/8–7/8 2.5Y). **Rhizomorphs** more aggregated at the base, pale brown (8/4 2.5Y), branched, narrowing towards the end, 0.30 mm in diam. Peridium 0.5–1.65 mm when fresh, rubbery in consistence, very pale brown (8/4 10YR). **Gleba** compact when young, becoming pulverulent at maturity, light brownish gray (6/2 10YR), grayish black (2.5 10YR), reddish brown (4/3 10YR) to dark brown (3/2 10YR).

Microcharacters - Basidiospores globose, echinulate, dark brown in KOH, 8–17 × 9–17 µm in diam., including ornamentation, n=120/2, coated by crowded curved spines. *Basidia* not observed. **Peridium** consisting of two distinct layers. **Exoperidium** a layer formed by hyphae simple-septate, with slightly thickened walls (ca. 1 µm), interwoven, often ramified and superimposed, hyaline to yellowish brown, 1.5–8.5 µm in diam. n=120/2. **Endoperidium** consisting of hyphae pseudoparenchymatous, hyaline, thick-walled (ca. 1 µm), rounded at the end, 2–21 µm in diam. n=120/2. **Trama** 1.5–9 µm in diam., hyphae hyaline, thin-walled (ca. 1µm), branched, simple-septate, clamp connections not observed. Conductive hyphae present, somewhat irregular in profile, filled with an amorphous yellowish brown content, up to 3–16 µm in diam. Clamp connections absent.

Distribution and habitat - Common in Southern Hemisphere, Asia, North America, and Europe (Guzmán, 1970). BRAZIL: Pernambuco State (GURGEL et al., 2008); Minas Gerais State, Rio de Janeiro, São Paulo State (GUZMÁN, 1970); Santa Catarina State (GIACHINI et al., 2000); Rio Grande do Sul State (CORTEZ et al., 2011). Associated to *Eucalyptus* sp.; probably ectomycorrhizal in *Eucalyptus* plantations.

Specimen examined - BRAZIL. Rio Grande do Sul State: *Bororé*. 24 August 2011, leg: M. A. Sulzbacher; A. Silveira; R. B. Steffen (SMDB 14.503; 14.505; 14.517); *Barra do Quaraí*. 23 August 2011, Leg: M. A Sulzbacher; A. Silveira; R. B Steffen (SMDB 14.507); *Jaguari (Serra do Chapadão)* - 19 January 2011, leg: D. P. Golle; M. A. Sulzbacher; R. B. Steffen (UFSM/SMDB 14. 508); 23 October 2010, leg: D. P Golle; M. A Sulzbacher, D. B Baldoni; M Lupatini (SMDB 14.516); *Caçapava do Sul*. 09 March 2012, leg: M. A. Sulzbacher; A. Silveira; R. B. Steffen; *Pinhal Grande*. 31 March 2013, leg: D. F. Montagner (SMDB 14.513); *Santana do Livramento*. 05 April 2013, leg: D. D. F. Montagner; A. Silveira; G. Coelho; D. B. Baldoni (SMDB 14.509; 14.510; 14.511); *Santa Maria*. 18 March 2013, leg: D. F. Montagner; A. Moro (SMDB 14.512). *Rosário do Sul*. 09 March 2012. leg: A. Silveira; G. Coelho; D. B. Baldoni; *São Francisco de Assis*. 23 May 2013, Leg: D. F. Montagner (SMDB 14.514).

Comments – Basidiome morphological features of *S. albidum* are somewhat variable, mainly in peridium thickness and spore size, likely reflecting the lack of knowledge on ontogenetic basidiome development. Some specimens present spore

size and ornamentation, thin peridium, and small squamulae similar those of *S. verrucosum*; It also resembles *S. cepa* by the spore size, peridium hyphal structure and thickness (GUZMÁN 1970).

Scleroderma citrinum Pers., Syn. Meth. Fung. 1:153, 1801.

FIGS. C-D

Macrocharacters - Basidiomata epigeous, 17.4–38 mm high, 25–67 mm in diam.; smooth depressed on top, globose to subglobose, yellowish brown (5/4 10YR) to light yellowish brown (6/4 10YR) when young, and to very pale brown (8/4 10YR), yellow (7/8–8/8 5YR) and brownish yellow (6/6–6/8 10YR) at maturity. Surface smooth when young, cracked at the sides and top when mature, cracks yellow (5/6 10YR) to dark yellowish brown (4/4 10YR), covered by scales irregular in shape (± 1 mm) yellowish brown (5/8 10YR) concolorous to the cracks to brownish yellow (6/6 10YR). **Rhizomorphs** numerous, small, 0.20–0.50 mm, concolorous aggregated the base, white (8/2 2.5Y) to pale yellow (8/4 10YR). **Peridium** 4 mm thick, rubbery when fresh, very pale yellow (9/2 2.5Y), bruising reddish yellow (7/6–6/6 7.5YR); dehiscence irregular, occurring by rupture of the apical portion. **Gleba** compact when young, white (8/1 5YR) to black (2.5/1 5YR), becoming powdery at maturity, olive brown (4/4 2.5Y) to olive yellow (6/8 5Y).

Microcharacters - Basidiospores globose reticulate, yellowish brown in KOH, 9–12 \times 14–16 μm in diam. $n=120/2$, including ornamentation; *Basidia* not observed; **Peridium** consisting of three layers. **Exoperidium** formed by hyphae interwoven, thin-walled (ca. 1 μm), hyaline, brownish yellow to rust brown in KOH, thick, 4–12 μm in diam. $n=120/2$. **Mesoperidium** formed by hyphae interwoven, septate, of hyaline hyphae, narrower than those of exoperidium, 2–8 μm in diam. $n=120/2$, slightly thickened walls (ca. 2 μm). **Endoperidium** formed by hyphae fibulate 2–4 μm in diam., thin-walled, hyaline. Clamp connections present.

Specimen examined - BRAZIL. Rio Grande do Sul State: *Santa Maria*. 28 March 2013, leg: D. F. Montagner (SMDB: 14.499; 14.500; 14.501; 14.502).

Distribution and habitat - North America, Central Europe, Asia, Africa, South America (Guzmán, 1970), and BRAZIL: States of Paraíba (GURGEL et al., 2008), São Paulo (BONONI et al., 1981), Paraná (MEIJER, 2006), Santa Catarina (GIACHINI et al., 2000), and Rio Grande do Sul State (SOBESTIANSKY, 2005;

CORTEZ et al., seria 2011? 2008). Associated to *Pinus taeda* L. plantations; ectomycorrhizal.

Comments – species of *S. citrinum* are the most easily recognized in the area, usually being found in *Pinus* spp. plantations; it grows somewhat variable in size, but usually are found as bigger basidiomes with an appearance of orange fruits on soil. They are characterized by thicker squamulose peridium with more vivid brownish colors, dehiscence irregular; microscopically, by its spores distinctly reticulate.

***Scleroderma* sp.**

FIGS: E-F

Macrocharacters - Basidiomata hypogeous, 31.4 mm high, 10.6–25.9 mm in diam., globose to subglobose in general, profile slightly altered in some parts, very pale brown (8/3–8/4 HUE 10YR) to yellow (8/6–8/8 HUE 10YR), slightly crackled on the surface; **rhizomorphs** scattered on surface. **Peridium** 1.5–2 mm thick upon drying, white (9.5/1 HUE 7.5YR), changing to reddish brown (5/4 HUE 2.5 YR) or light red (7/6–6/6 HUE 2.5YR) where sectioned or bruised. **Gleba** compact when young, powdery and cottony in aspect when mature, very pale brown (8/3 HUE 10YR) when growing, dark brown (3/2 HUE 7.5YR), very dark brown (2.5/2 HUE 7.5YR), to dark black (2.5 HUE 10YR) when mature, with irregular pale colored tramal veins separating globose dark colored hymenial zones at maturity, veins very pale yellow (9.5 HUE 2.5Y).

Microcharacters - Basidiospores globose, dark yellowish brown in KOH, echinulate, with small and curved spines, (5–)7–10(–12.5) μm in diam., n=129/2, including ornamentation, (2–)5–9(–11) μm in diam., n=120/2, not included ornamentation. Basidia not observed. **Peridium** consisting of two distinct layers; **exoperidium** formed by narrow hyphae with pale yellow crystals adhered on surface, hyphae with clamp connections, thin-walled (ca. 1 μm), randomly intertwined, hyaline, brownish yellow to rust brown, 2–9 μm in diam., n=120/2; **endoperidium** consisting of hyphae intertwined, thick-walled (1–4 μm), hyaline, 2–12 μm in diam., n=120/2, clamp connections scattered. **Rhizomorphs** dark yellowish brown in KOH, hyphae parallel, with small crystals adhered on surface, 1–4 μm in diam., clamp connections abundant; **Trama** formed by hyphae hyaline, thin-walled, branched, 1–5 μm in diam.

Distribution and habitat - Hypogeous, associated to *Eucalyptus* spp. and *Acacia mearnsi* De Willd., plantations, in sandy acid soil (ca. pH 3.8) contaminated with coal mine wastes and poor organic matter; species in the genus are considered as ectomycorrhizal fungi.

Specimens examined - BRAZIL. Rio Grande do Sul State: *Candiota*. 27 April, 2012, leg: A. O. Silveira (UFSM/ PM73;74).

Comments – Specimens of *Scleroderma* sp. resembles those described as *Scleroderma bougherii* for also growing as hypogeous in *Eucalyptus* plantations's soils, besides presenting a dark colored powdery gleba at maturity and echinulate spores (GIACHINI et al., 2000). The former species differs in having a distinct and thicker (2 mm) two-layered peridium, while the latter has thinner (1–2 mm) and one-layered peridium. Spores in *Scleroderma* sp. are somewhat smaller (6–12 × 5–12.5 µm including ornamentation, while, in *S. bougherii*, they were recorded as 7.5–11.5 µm without spiny ornamentation, which are 0.5–1.5 µm. Unfortunately, original specimens and holotypus of *S. bougherii* were not available for study; we only have analyzed the specimen RVP 068 of *S. bougherii* received from herbarium MIP (a personal Giachini's herbarium), but its spores have a reticulate ornamentation, instead of echinulate, representing a different species.

PHYLOGENETIC ANALYSIS

After sequencing, it were obtained 20 fragments from 610 bp to 831 bp of nrDNA ITS region. Phylogenetic analysis based on ITS sequences supported the genus segregation in two major clades of species; clade 1 named for grouping species with echinulate-subreticulate spores plus simple septate hyphae and clade 2 for species with reticulate spores plus clamped hyphae; These data have already been supported by other authors (PHOSRI et al., 2009; SANON et al., 2009; NOUHRA et al., 2012; KUMLA et al., 2013). This infrageneric separation was initially proposed by Guzmán (1970), but instead, splitting *Scleroderma* in tree sections based on basidiospore ornamentation, as follows: Section *Scleroderma* for reticulate spores; *Aculeatispora* for spiny spores; and additionally *Sclerangium* for subreticulate spores.

As shown in topology of *Scleroderma* phylogenetics tree (Fig. 1), Clade 1 included only species with echinulate to subreticulate spores, such as: *S. albidum*, *S. areolatum*, and *S. polyrrhizum*. Most of sequences (15 among 20) generated for this study nested together in a conspecific group we called *S. albidum* clade; this fact is

remarkable, because they seemed to represent a group of different species under preliminar morphology observation, showing some variation in basidiome appearance, spore ornamentation and spore size. All specimens have shown to be genetically closely related, without dependence of their diverse collection's places from study area. In this clade albidum, sequences named as *Scleroderma bovista* (KF881875; HM237175) e *S. aurantium* (HM237174), two taxa known by their reticulate spores and clamped hyphae (COKER & COUCH, 1928), must represent erroneous identifications by presenting highest similarity with other *S. albidum* sequences – obtained from specimens with echinulate spores and simple-septate hyphae. Sequences of *Scleroderma* sp. (FN669245; JQ685728) from Estonia and Montenegro also claded along with *S. albidum* specimens and are herein conceived as conspecific.

Clado 2 (Fig.1) nested only species with reticulate spores plus fibulate hyphae coinciding with sect. *Scleroderma* sensu Guzmán (1970), it formed two groups (*S. bovista* and *S. citrinum*). A Brazilian sequence PM 108 formed a well supported *S. citrinum* clade (BT value 96%) and high BLAST similarity (98%) with other sequences from China, USA, and Germany.

Two sequences named as *Scleroderma* sp, UFSM/PM 73 and UFSM/PM74, nested together in a well supported clade with high bootstrap value (100 %) and apart from the other two clades (Fig. 1). Their specimens are characterized by presenting hypogeous development, two peridial hyphal layers, clamps and cristals addered on exoperidial hyphal surface, and spores echinulate, 5–12.5 µm. *Scleroderma* sp. and *S. bougherii* (GIACHINI et al., 2000), represent rule's exceptions, because they present a combination of clamped hyphae and echinulate spores; unfortunately, *S. bougherii* was not accessed through molecular approach for comparison. Sequences of *Scleroderma* sp. clustered in a terminal branch apart from clades 1 and 2 in topology tree. It can indicate a new clade formation in which species present a combination of echinulate spores and clamped hyphae *Scleroderma bougherii* also present this combination and are close related to *Scleroderma* sp. so a molecular study of the former are required for accessing its phylogenetic relationships between species in the genus and either its conspecificity or separation from *Scleroderma* sp.

A restricted set of morphological characters and their states have been a recognized problem in *Scleroderma* taxonomy becoming its knowledge efforts

insufficient for discriminating species. Other question comes from basidiome structure, which can be influenced by soil and environment conditions (KAZUYA et al., 2008). Molecular data on the genus must be increasingly generated and used for establishing the limits and phylogenetic relationships of their species (SANON et al., 2009).

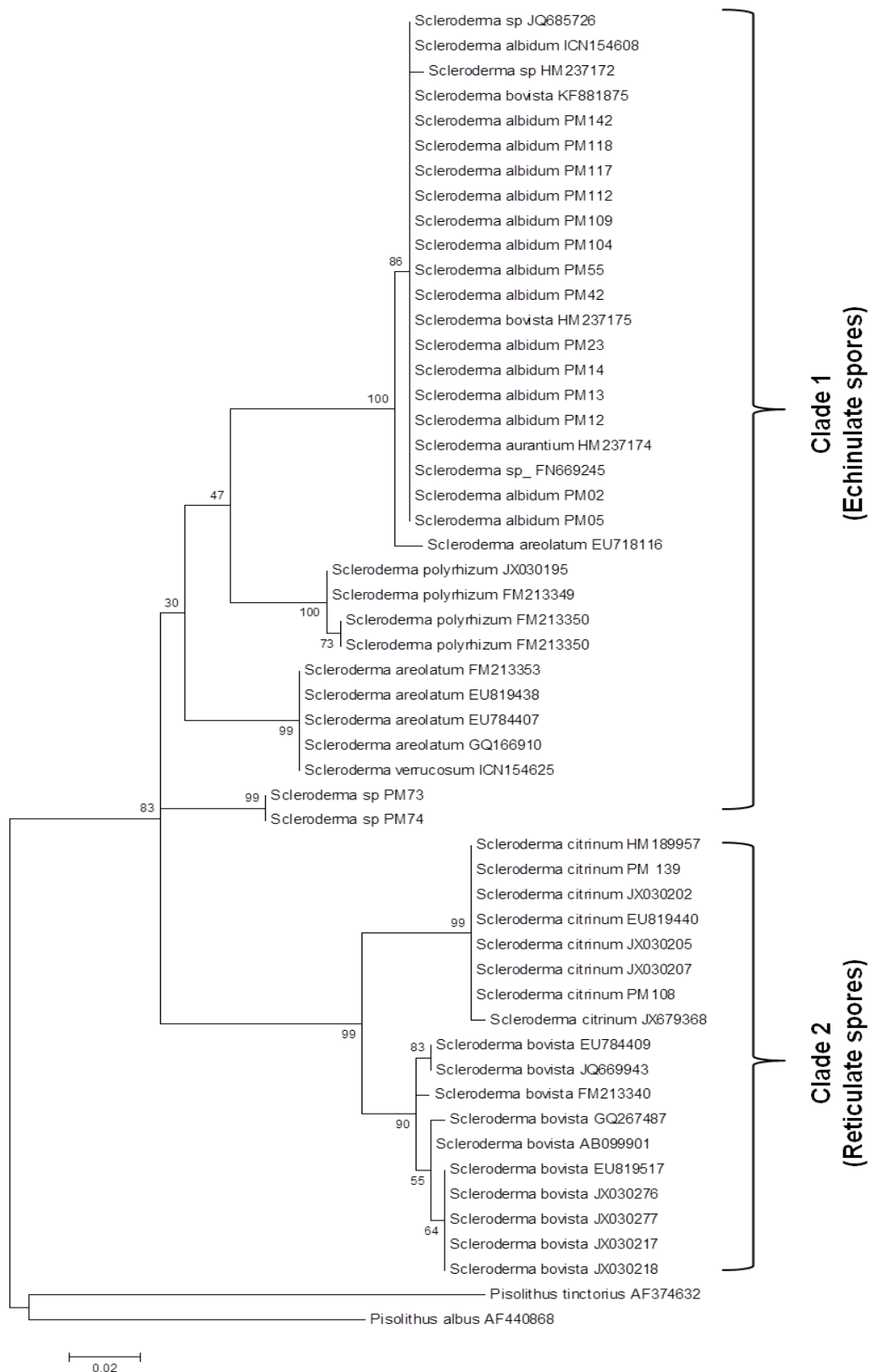


FIG. 1 - Phylogenetic reconstruction of the genus *Scleroderma*, obtained from ITS1-5.8S-ITS2 sequences. Bootstrap values (in %) are from maximum likelihood (ML) analyses (1000 bootstraps). The 20 *Scleroderma* new sequences generated in this study are labeled with the isolation DNA code in Table 2. Sequences from *Pisolithus tinctorius* and *P. albus* were used as outgroup.

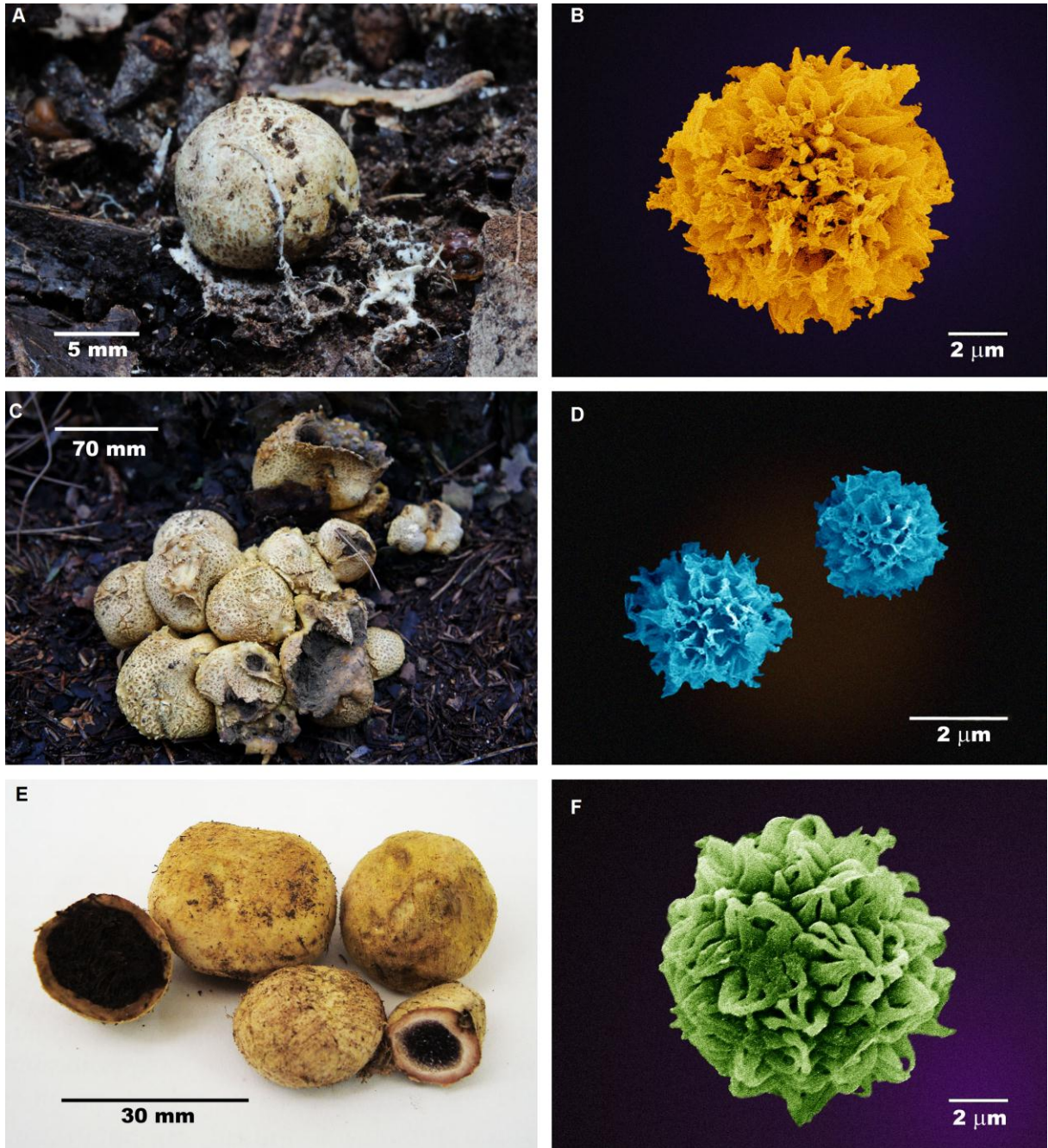


FIG. 2 - Basidiomes and spores of *Scleroderma* species. A-B. *S. albidum*. C-D. *S. citrinum*. E-F. *Scleroderma* sp.: Fonte: MONTAGNER, F. M; SILVEIRA, O. A; COELHO, G, 2013.

Literature Cited

BALDONI, D. B; COELHO, G; JACQUES, R. J. S et al. Brown rotting fungus closely related to *Pseudomerulius curtisii* (Boletales). **Mycosphere**, v. 3, n. 5, 2012.

BASEIA, I. G; MILANEZ, A. I. First record of *Scleroderma polyrhizum* Pers. (Gasteromycetes) from Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, n. 1, p.181–184, 2000.

BOLDRINI, I. L; FERREIRA, P. M. A; ANDRADE, B. O et al. **Bioma Pampa: diversidade florística e fisionômica**. Editora Pallotti, Porto Alegre, p. 12-13, 2010.

BONONI, V. L. R; TRUFEM, S. F. B; GRANDI, R. A. P. Fungos macroscópicos do Parque Estadual das fontes do Ipiranga depositados no Herbário do instituto de Botânica. **Rickia**, v. 9, n. 1, p. 37-53, 1981.

BRUNDRETT M, BOUGHER N, DELL B, GROVE T, MALAJCZUK N. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra, ACIAR, Monograph, v. 32, p. 373, 1996.

CHEN, Y. L; DELL, B; MALAJCZUK, N. Efect of *Scleroderma* spore density and age on mycorrhiza formation and growth of containerized *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urophylla* seedlings. **New Forest**, v. 31, p. 453–467, 2006

COKER, W. C, COUCH, J. N. **The Gasteromycetes of Eastern United States and Canada**. Chapel Hill, 201 p. 1928,

CORTEZ, V. G; BASEIA, I. G; SILVEIRA, R. M. B. Gasteroid Mycobiota of Rio Grande do Sul, Brazil: Boletales. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 2, n. 4, p. 44 -52, 2011.

DUÑABEITIA, M. K; HORMILLA, S; GARCIA-PLAZAOLA, J. I; TXARTERINA, K; ARTECHE, U; BECERRIL, J. M. Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. **Mycorrhiza**, v.14, n.1, p. 11-18, 2004.

GARDES, M; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**. v. 2, n. 2, p. 113-8, 1993.

GIACHINI, A. J; OLIVEIRA, V. L; CASTELLANO, M. A; TRAPPE, J. M. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. **Mycologia**, v. 92, n. 1, p. 1166–1177, 2000.

GURGEL, F. E; SILVA, B. D. B; BASEIA, I. G. New records of *Scleroderma* from Northeastern Brazil. **Mycotaxon**, v. 105, n. 1, p. 399-405, 2008.

GUZMÁN, G. Monografía del género *Scleroderma* Pers. emend. Fr. (Fungi-Basidiomycetes). **Darwiniana**, v. 16, n. 1, p. 233–407, 1970.

IBGE - Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Mapa dos biomas brasileiros**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomas.shtm>>. Acesso em 22 de jun de 2012.

IGANCI, J. R. V.; HEIDEN, G.; MIOTTO, S. T. S et al. Campos de cima da serra: the Brazilian subtropical highland grasslands show an unexpected level of plant endemism. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, n. 1, p. 378-393, 2011.

KASUYA, M. C. M; COELHO, I. D; TAMAI, Y; MIYAMOTO, T; YAJIMA, T. Morphological and molecular characterization of *Pisolithus* occurring in Hokkaido Island, Northern Japan. **Mycoscience**. v. 49, n. 5, p. 334-338, 2008.

KUMLA, J; SUWANNARACH, N; BUSSABAN, B; LUMYONG, S. *Scleroderma suthepense*, a new ectomycorrhizal fungus from Thailand. **Mycotaxon**, v. 123, n. 1, p. 1-7, 2013.

MUNSELL SOIL COLOR CHARTS – Macbeth Division of Kollinorgen Instruments Corporation, 2009

MASON, P. A; INGLEBRY, K; MUNRO, R. C; WILSON, J; IBRAHIM, K. The effect of reduced phosphorus concentration on mycorrhizal development and growth of *Eucalyptus globulus* Labill. seedlings inoculated with 10 different fungi. **Forest Ecology and Management**, v. 128, n. 1, p. 249-258, 2000.

MEIJER, A. A. R. de. Preliminary list of the Macromycetes from the Brazilian State of Paraná. **Boletim do Museu Botânico Municipal**, Curitiba, v. 68, p. 01-58, 2006.

NOUHRA, E. R; CAFFOT, M. L. H; PASTOR, N; CRESPO, E. M. The species of *Scleroderma* from Argentina, including a new species from the *Nothofagus* forest. **Mycologia**, v. 104, n. 1, p. 488–495, 2012.

ORTEGA, V; DUNABEITIA, M; MENENDEZ, S; GONZÁLEZ-MURUA, C; MAJADA, J. Effectiveness of mycorrhizal inoculation in the nursery on growth and water relations of *Pinus radiata* in different water regimes. **Tree Physiol**, v. 24, n. 1, p. 65-73, 2004.

POSADA, D. **ModelTest Server**: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Research* 34, W700–W703, 2006.

PHOSRI, C; MARTÍN, M. P; WATLING, R; JEPPSON, M; SIHANONTH, P. Molecular phylogeny and re-assessment of some *Scleroderma* spp. (*Gasteromycetes*). **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 166, n. 1, p. 83–91, 2009.

SANON, K. B, BÂ, A. M, DELARUELALE, C; DUPONNOIS, R; MARTIN, F. Morphological and molecular analyses in *Scleroderma* species associated with some caesalpinoid legumes, *Dipterocarpaceae* and *Phyllanthaceae* trees in southern Burkina Faso. **Mycorrhiza**, v. 19, n. 1, p. 571–584, 2009.

SIMS, K. P; WATLING, R; JEFFRIES, P. A revised key to the genus *Scleroderma*. **Mycotaxon**, v. 56, n. 1, p. 403-420, 1995.

SOBESTIANSKY, G. Contribution to a macromycete survey of the States of Rio Grande do Sul and Santa Catarina in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 437-457, 2005.

STADEN, R; JUDGE, D. P; BONFIELD, J. K. Analysing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. **Introduction to Bioinformatics**. A Theoretical and Practical Approach. Eds. Stephen A. Krawetz and David D. Womble. Human Press Inc., Totawa, NJ 07512, p. 393-410, 2003.

TAMURA, K.; KUMAR, S.; NEI, M. Mega: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Baltimore, v. 5, n. 1, p. 150-163, 2011.

WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A. et al. (Eds.) PCR protocols. A guide to methods and applications. **Academic press**, San Diego, p. 315-322. 1990.

YOUSAF, N; KHALID, A. N; NIAZI, A. R. New records of *Scleroderma* species (*Sclerodermataceae*, *Agaricomycetes*) from Pakistan. **Mycotaxon**, v. 122, n. 8, p. 43-50, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado demonstrou que os fungos do gênero *Scleroderma* são encontrados em associação com povoamentos florestais exóticos na região do bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Espécies nativas de *Scleroderma* são ainda desconhecidas para o bioma Pampa.

Os basidiomas apresentaram grandes dificuldades para identificação fundamentada exclusivamente nas características morfológicas dos basidiomas. A análise embasada em dados moleculares e filogenéticos, representa uma forma confiável para segregação e identificação das espécies.

Scleroderma albidum foi uma das espécies que apresentou maior variação morfológica dentre as espécies encontradas. A espécie envolveu o maior número de sequências obtidas para o estudo molecular e permitiu reidentificar as sequências tais: JQ685726; HM237172; KF881875; HM237175; HM237174; FN669245; EU718116 depositadas no GenBank com diferentes nomes, *Scleroderma* sp.; *S. bovista*; *S. aurantium*; *S. areolatum*.

O conhecimento do gênero *Scleroderma* e sua relação simbiótica com as espécies florestais, pode facilitar a realização de novos estudos contribuindo para a recuperação de ambientes degradados, na área biotecnológica e de produção vegetal. O registro de espécimes de *Scleroderma* coletados sobre área de mineração de carvão, Mina de Candiota, Rio Grande do Sul, identificados como *Scleroderma* sp., deve ser aprofundado com novas pesquisas, não somente pelo fato de serem encontradas em condições extremas de pH, mas também para estabelecer sua identidade no gênero e suas relações filogenéticas.

A utilização de uma abordagem integrativa, a partir de análises morfológicas e filogenéticas, mostrou-se eficiente no avanço no entendimento taxonômico do complexo de espécies deste grupo de fungos. Permitindo e, também, gerar novas sequências para o banco dados do GenBank e re-identificar outras já depositadas.

Os espécimes coletados para este permanecem disponíveis no herbário SMBD para posteriores estudos abrindo a possibilidade de dar seguimento aos estudos sobre o gênero *Scleroderma*, nas diferentes áreas de interesse para produção do conhecimento.