



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS, ALGAS E
PLANTAS

CARINA CZERENCHA GENEBRA

**Relações ectomicorrízicas em Russulaceae Lotsy: estudo de caso em áreas de Mata
Atlântica da Ilha de Santa Catarina**

Florianópolis

2021

Carina Czerencha Genebra

Relações ectomicorrízicas em Russulaceae Lotsy: estudo de caso em áreas de Mata Atlântica da Ilha de Santa Catarina

Dissertação submetida ao Programa de Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.
Orientadora: Profa. Dra. Maria Alice Neves
Coorientadora: Profa. Dra. Aída Marcela Vasco-Palacios

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra

Genebra, Carina Czerencha

Relações ectomicorrízicas em Russulaceae Lotsy: estudo de caso em áreas de Mata Atlântica da Ilha de Santa Catarina / Carina Czerencha Genebra ; orientadora, Maria Alice Neves, coorientadora, Aída Marcela Vasco-Palacios, 2021.

41 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Biologia de Fungos. 3. Ectomicorrizas. 4. Fungos. 5. Russulaceae. I. Neves, Maria Alice. II. Vasco-Palacios, Aída Marcela. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

Carina Czerencha Genebra

Relações ectomicorrízicas em Russulaceae Lotsy: estudo de caso em áreas de Mata Atlântica da Ilha de Santa Catarina

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Admir Giachini, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Paulo Tamasso Miotto, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Prof. Dr.(a) Mayara Krasinski Caddah
Coordenadora do Programa

Prof. Dr.(a) Maria Alice Neves
Orientadora

Florianópolis, 26 de janeiro de 2021.

Este trabalho é dedicado aos meus pais que sempre me deram todo o apoio necessário, a minha orientadora Maria Alice que sempre me ensinou e ajudou com paciência e aos meus colegas do MICOLAB por todo companheirismo e auxílio quando necessário.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa que permitiu dois anos de formação acadêmica de qualidade e à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) que permitiu estudar numa universidade pública, gratuita e de qualidade. À Floram (Fundação Municipal do Meio Ambiente) e ao Ima (Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina) por nos permitir realizar coletas nos parques da cidade de Florianópolis – SC e região.

Agradeço a minha orientadora Maria Alice Neves, por ter me dado a oportunidade de fazer parte desse projeto lindo das ectomicorrizas, pela paciência e por todo conhecimento que compartilhou comigo. À minha coorientadora Aída Marcela Vasco-Palacios que sempre foi muito atenciosa e aceitou encarar esse desafio conosco. Agradeço ao Programa de pós-graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas e toda sua equipe de funcionários, alunos e professores, pela oportunidade de fazer parte desse time. Em especial a professora Mayara K. Caddah que sempre que pode me ajudou na identificação das plantas, a Fernanda M. Cordeiro de Oliveira e a Makeli G. Lusa que me ajudaram e ensinaram muito sobre anatomia vegetal. Ao LAMEB que me deu todo o suporte e principalmente ao William que sempre me socorreu e ajudou durante as PCRs.

Agradeço aos meus amigos do MICOLAB, que me acolheram e me ensinaram muito sobre o mundo dos fungos, saudades dos nossos cafés da tarde e bares com muitas risadas e momentos que jamais esquecerei. Em especial a Ariadne, Marivane e Lara que sempre me acompanharam nas coletas e nas triagens das ECM, aprendi muito com vocês e a Duda minha companheira de militância durante a greve. Queria agradecer também ao Rafael Cruz que me ajudou em muitos momentos nas análises moleculares, a Duane Fernandes que foi essencial me ensinando e auxiliando nas análises moleculares e filogenia e Indiani que me ajudou com as revisões.

Queria agradecer imensamente aos meus pais e minha irmã por todo amor, sempre me incentivarem e me ajudarem em todos os momentos da minha vida até chegar aqui, mesmo sabendo que ficaríamos longe, sem eles esse sonho não seria possível.

Agradeço a Thais Alves do Amaral que sempre esteve do meu lado em tantos momentos e sempre me incentivou muito, tornando essa caminhada mais fácil juntamente com o Barto que foi meu companheiro em muitos momentos e ao Bruno Carmona que me ajudou e sempre esteve presente quando precisei. À Thais Wolmann, Lorena, Luis e Ninja

(Mateus) que foram de grande importância na minha vida durante a quarentena e fizeram que esse período fosse um pouco mais leve. E a todos que de alguma forma passaram pelo meu caminho e somaram nessa caminhada. Obrigada!

Mycelium is Earth's natural Internet (Paul Stamets, 2008)

RESUMO

Os fungos são de grande importância para os ecossistemas e participam de interações e associações com outros seres vivos, como é o caso das ectomicorrizas, associações simbióticas onde os fungos atuam como expansão radicular das plantas e realizam troca de nutrientes e água. Nas últimas décadas os fungos ectomicorrízicos e seus simbiosites passaram a ser mais estudados em regiões tropicais. Na Ilha de Santa Catarina há registros de espécimes ectomicorrízicos da família Russulaceae coletados em regiões de Mata Atlântica. O objetivo deste trabalho foi de registrar associações entre fungos da família Russulaceae e plantas nativas da Mata Atlântica na Ilha de Santa Catarina, diferenciar e caracterizar os morfotipos de ectomicorrizas e identificar os simbiosites. O estudo foi realizado no litoral sul do Brasil, em remanescentes de Mata Atlântica situados em Florianópolis, Santa Catarina. Os basidiomas e solo com raízes abaixo deles foram coletados. Em laboratório foram realizadas análises micromorfológicas e macromorfológicas dos basidiomas e das ectomicorrizas encontradas. Para a identificação molecular dos parceiros simbiosites (fungo e planta) foram utilizadas as regiões ITS (*internal transcribed spacer* do rDNA) específicas para fungos e para plantas. Foram sequenciados os basidiomas, as ectomicorrizas e as raízes. Foram coletados 27 basidiomas pertencentes à família Russulaceae. Foram observadas 106 raízes micorrizadas e 44 morfotipos foram diferenciados. Dentre as sequências obtidas das ectomicorrizas, 4 são de Russulaceae. A partir das raízes foram obtidas 2 sequências que correspondem a *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) e uma espécie de *Dalechampia* (Euphorbiaceae). A presença de associação ectomicorrízica entre Russulaceae e plantas nativas da Mata Atlântica é pouco conhecida e possivelmente há mais parceiros vegetais envolvidos. É importante continuar a conhecer a diversidade sobre e sob o solo em regiões onde quase nada se sabe sobre essa simbiose.

Palavras-chave: Brasil. Ectomicorriza. *Lactifluus*. Neotropical. Nyctaginaceae. *Russula*.

ABSTRACT

Fungi are of great importance for many ecosystems and interact and associate with other living beings. This is the case for ectomycorrhizae that are symbiotic associations where fungi act as root expansions of the plants and exchange nutrients and water. In the last decades ectomycorrhizal fungi and their symbionts have been more studied in tropical regions. On Santa Catarina Island there are records of ectomycorrhizal specimens from the Russulaceae family collected in the coastal regions of the Atlantic Forest. The aim of this work was to register associations between fungi of the Russulaceae family and native plants of the Atlantic Forest on Santa Catarina Island, to differentiate and characterize the ectomycorrhizal morphotypes and identify the symbionts. The study was made on the southern coast of Brazil, in remnants of the Atlantic Forest located in Florianópolis, Santa Catarina. Basidiomes and soil with roots below them were collected. Micromorphological and macromorphological analyzes of the basidiomes and the ectomycorrhizae were performed. For the molecular identification of symbiotic partners (fungus and plant), specific ITS (*internal transcribed spacer* do rDNA) regions for fungi and plants were used. Basidiomes and roots (with and without mantle) were sequenced. Twenty-seven basidiomes belonging to the Russulaceae were collected and 106 mycorrhizal roots were observed and separated into 44 morphotypes. Among the sequences obtained from the ectomycorrhizae only 4 were from Russulaceae. Two sequences obtained from the roots corresponded to *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) and a species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae). The presence of an ectomycorrhizal association between Russulaceae and native plants of the Atlantic Forest is mostly unknown and possibly more plant partners are involved. It is of great importance to continue to study the diversity above and below ground, mainly in regions where almost nothing is known about this symbiosis.

Keywords: Brazil. Ectomycorrhiza. *Lactifluus*. Neotropical. Nyctaginaceae. *Russula*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Registros dos basidiomas ectomicorrízicos. A) <i>Russula</i> sp. – CCG008, B) <i>Russula puiggarii</i> – CCG016, C) <i>Lactifluus</i> sp. – CCG068, D) <i>Lactifluus catarinensis</i> – CCG015, E) <i>Russula rubropunctatissima</i> – CCG069, F) <i>Russula puiggarii</i> – CCG064..... | 12 |
| Figura 2 - ECMs morfotipadas. A) R61M34, B) R24M23, C) Corte em microscópio óptico do morfotipo R24M23, onde é possível observar rede de Hartig (RH), manto (MN) e cistídio, D) <i>Tomentella</i> sp. - R67M36, E) <i>Lactifluus</i> sp. - R65M36 F) <i>Lactifluus</i> sp. - R92M23. | 13 |
| Figura 3 - <i>Guapira opposita</i> . A) Frutos B) Inflorescência..... | 15 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Basidiomas ectomicorrízicos em diferentes localidades da Ilha de Santa Catarina. | 10 |
| Tabela 2 - Fungos associados a raízes (ECM) em diferentes localidades da Ilha de Santa Catarina..... | 13 |
| Tabela 3 - Simbiontes ectomicorrízicos (plantas) em diferentes localidades da Ilha de Santa Catarina..... | 15 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 ECTOMICORRIZAS | 1 |
| 1.1.1 Ectomicorrizas em regiões tropicais | 2 |
| 1.2 RUSSULACEAE | 3 |
| 2 OBJETIVOS | 5 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 5 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 5 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 6 |
| 3.1 ÁREA DE ESTUDO | 6 |
| 3.2 COLETA DE BASIDIOMAS | 6 |
| 3.3 COLETA DE RAÍZES | 6 |
| 3.4 ANÁLISE DOS MATERIAIS | 7 |
| 3.4.1 Estudos morfológicos | 7 |
| 3.5 ESTUDOS MOLECULARES | 8 |
| 4 RESULTADOS | 10 |
| 4.1 RESULTADOS GERAIS | 10 |
| 4.2 CAPÍTULO 1 | 16 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 29 |
| 6 CONCLUSÃO | 31 |
| REFERÊNCIAS | 32 |
| APÊNDICE A – Protocolo de extração de DNA (Basidiomas) | 37 |
| APÊNDICE B – Protocolo de extração de DNA (Raiz) | 38 |
| APÊNDICE C – Protocolo de PCR direta (ECMs) | 39 |
| APÊNDICE D – Protocolo de PCR ITS (Basidioma) | 39 |
| APÊNDICE E – Protocolo de PCR ITS (Raiz) | 39 |
| APÊNDICE F – Protocolo de Purificação | 40 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 ECTOMICORRIZAS

Os fungos constituem um dos maiores grupos de eucariotos e possuem grande importância na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas. Cerca de 80% das plantas terrestres formam algum tipo de associação simbiótica com fungos micorrízicos e acredita-se que muitos se encontram em habitats ainda pouco estudados. Além de conhecer a diversidade, é necessário estudar as funções dos fungos no meio ambiente, pois muitos participam de interações e associações com outros organismos, como é o caso das associações micorrízicas (Landeweert *et al.*, 2001; Blackwell, 2011; Tedersoo *et al.*, 2018).

As micorrizas são associações simbióticas mutualistas entre determinados fungos e raízes das plantas. O termo micorriza (do Grego *mykes*: fungo e *rhiza*: raiz) foi proposto pelo pesquisador alemão Albert Frank, em 1885. Nessas associações, os fungos são parceiros mutualistas essenciais para muitas plantas. Por exemplo, um único fungo pode se associar com diferentes plantas por meio do micélio, estabelecendo assim, uma rede de conexão micorrízica entre indivíduos vegetais distintos e que se expande no substrato, atuando como uma extensão substancial do sistema radicular. Ainda, o micélio auxilia a planta na obtenção de água, nitrogênio (N), fósforo (P) e outros nutrientes do solo em troca do carbono (C) produzido pela planta, contribuindo para a manutenção das florestas e fornecendo tolerância a estresses ambientais (Maia, 2010; Blackwell, 2011; Kumar *et al.*, 2017; Vanegas-León, 2017; Corrales *et al.*, 2018; Looney *et al.*, 2018; Genre *et al.*, 2020). Portanto, as micorrizas são essenciais para o crescimento das plantas e são reconhecida quatro tipos principais de associações, de acordo com sua estrutura, função e parceiros envolvidos: as ectomicorrizas (ECMs), micorrizas vesículo-arbusculares (FMA), micorrizas de orquídeas e micorrizas ericóides (Wurzburger *et al.*, 2018; Vasco-Palacios *et al.*, 2018).

Os fungos micorrízicos também fornecem muitos serviços ecossistêmicos em ambientes naturais e agrícolas. Por exemplo, as ECMs são de grande importância na recuperação de ecossistemas terrestres degradados. Estudos demonstram que as inoculações micorrízicas no solo auxiliam o estabelecimento das plantas no ambiente, promovendo riqueza de espécies vegetais, o desenvolvimento de sementes e a facilitação do estabelecimento de plântulas onde os recursos são escassos no solo, auxiliando-as através da

transferência de C e N de árvores adultas (Neuenkamp *et al.*, 2019; Genre *et al.*, 2020; Pec *et al.*, 2020).

Nas últimas décadas as florestas tropicais passaram a ser mais estudadas com relação à diversidade de fungos ectomicorrízicos. As ECMs tropicais são altamente diversificadas e variam amplamente em termos de abundância, diversidade, composição e afinidades filogenéticas de plantas e fungos (Alvarez-Manjarrez *et al.*, 2017; Corrales *et al.*, 2018; Freire *et al.*, 2018). Estima-se que atualmente, aproximadamente 6.000 espécies de fungos e 20.000 a 50.000 espécies de plantas realizam associação ectomicorrízica (Vasco-Palacios *et al.*, 2018; Genre *et al.*, 2020).

Há cerca de 30 anos, as ECMs começaram a ser estudadas e descritas de acordo com a sua morfologia macroscópica e detalhes anatômicos da interação entre as hifas e as células da planta (Natarajan, Mohan, 2002; Buyck *et al.*, 2018). Nas plantas ectomicorrízicas, parte do sistema radicular é caracterizado pela formação do manto de hifas ao redor da ponta da raiz, uma rede de hifas que se distribui entre as células do córtex (denominada Rede de Hartig), e pelo micélio externo que se propaga no solo fazendo a conexão entre a raiz e o solo, absorvendo assim, nutrientes e água (Manoharachary, Mukerji, 2002; Maia, 2010). As camadas de manto, estrutura de rizomorfos, formas de cistídios, características de hifas emanantes, cor da ECM e a presença de reações químicas são algumas das características informativas para o reconhecimento taxonômico do fungo associado à ponta da raiz (Agerer, 2006).

1.1.1 Ectomicorrizas em regiões tropicais

As associações ectomicorrízicas foram historicamente consideradas raras ou ausentes nos ecossistemas tropicais, sendo consideradas quase exclusivas de regiões temperadas e circumboreais. Isso aconteceu devido à dificuldade em rastrear as raízes e identificar os simbiossiontes em florestas hiperdiversas (como as tropicais), e à ausência de um manto conspícuo nas raízes nos ecossistemas tropicais. No entanto, nas últimas décadas esse paradigma vem se alterando com a identificação e registro de fungos ectomicorrízicos em muitas regiões tropicais. Fungos ectomicorrízicos foram registrados em 23 dos 27 estados do Brasil, com maior frequência nas regiões litorâneas, onde possui mais micólogos e mais projetos em andamento com esse viés (Roy *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2017; Corrales *et al.*, 2018; Freire *et al.*, 2018; Vasco-Palacios *et al.*, 2018).

As relações ectomicorrízicas podem ser mais ou menos complexas, ocorrendo variações entre fungos e plantas, que podem ou não serem dependentes da simbiose. Em geral, as plantas ectomicorrízicas não são exclusivas quanto ao parceiro fúngico, e somente algumas são específicas, podendo ter diversas possibilidades de interações. Por exemplo, as relações podem incluir um fungo e uma planta, vários fungos conectados à mesma planta ou várias plantas associadas ao mesmo fungo e, finalmente, vários fungos e várias plantas associados entre si (Maia, 2010). Na Ilha de Santa Catarina há registro de espécies de *Lactarius*, *Lactifluus* e *Russula* coletados em regiões de Mata Atlântica (Jaeger, 2013; Duque-Barbosa, 2016; Vanegas-León, 2017). Vanegas-León (2017) identificou molecularmente amostras de ectomicorrizas de Russulaceae Lhotsky, onde em duas amostras a identificação molecular mostrou Russulaceae associada às raízes de Nyctaginaceae Juss. e Moraceae Gaudich. Além disso, em regiões temperadas espécies de Elaeocarpaceae Juss., Ericaceae Juss., Euphorbiaceae Juss., Myrtaceae Juss., Nyctaginaceae, Polygonaceae A. Juss., Salicaceae Mirb., Rosaceae Juss. e Ulmaceae Mirb. fazem associações ectomicorrízicas com membros de Russulaceae (Agerer; Rambold, 2004 – 2020). Essas famílias também ocorrem na Mata Atlântica na Ilha de Santa Catarina (BFG, 2015) e possivelmente estão relacionadas com espécies de Russulaceae. Contudo, é possível que outras famílias de plantas que ocorrem na Mata Atlântica também sejam ectomicorrízicas, mas a simbiose nunca tenha sido registrada.

1.2 RUSSULACEAE

A família Russulaceae Lhotsky (Russulales, Basidiomycota) compreende o grupo de cogumelos que mais possui registros do hábito ectomicorrízico, hábito que surgiu pelo menos duas vezes durante o processo evolutivo de Russulales (uma vez em Russulaceae e novamente em Albatrellaceae) (Looney *et al.*, 2018). A maioria dos espécimes da família tem forma agaricóide, mas há também espécies pleurotóides, secotióides e gasteróides, que compartilham as mesmas características microscópicas. Segundo Agerer (2006), as ECMs dessa família são caracterizadas por serem lisas e hidrofílicas. Em Russulaceae os gêneros *Russula* Pers., *Lactarius* Pers., *Lactifluus* (Pers.) Roussel e *Multifurca* Byuck & Hofstetter., são conhecidos como ectomicorrízicos. Esses gêneros têm sido muito estudados na Europa e América do Norte, e mais recentemente na África e na região neotropical. Algumas espécies foram encontradas associadas a raízes de Fabaceae Lindl., Nyctaginaceae e Polygonaceae A.

Juss. na região amazônica da Venezuela, Brasil, Equador e Colômbia (Buyck *et al.*, 2008; Vanegas-León, 2017; Buyck *et al.*, 2018; Vasco-Palacios *et al.*, 2018). Na Ilha de Santa Catarina, de acordo com a BFG (2015), há registros de espécies de *Lactarius*, *Lactifluus* e *Russula*. Duque-Barbosa (2016) registrou novos táxons, de *Russula* e *Lactifluus* e descreveu recentemente novas espécies de *Lactifluus* (Duque-Barbosa *et al.*, 2020), porém não existem registros de associações ectomicorrízicas dessas espécies com plantas nativas do Sul do Brasil, tornando esse trabalho inédito e de grande importância auxiliando trabalhos futuros para que novas interações entre fungos e plantas nativas da Ilha de Santa Catarina sejam descritas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a associação ectomicorrízica de fungos da família Russulaceae em plantas nativas da Mata Atlântica na Ilha de Santa Catarina

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ampliar o conhecimento da biodiversidade de ECMs da família Russulaceae ocorrentes em áreas de Mata Atlântica da Ilha de Santa Catarina;
- Identificar simbiontes vegetais ocorrentes em áreas de Mata Atlântica da Ilha de Santa Catarina;
- Identificar espécies de fungos ectomicorrízicos da família Russulaceae ocorrentes em áreas de Mata Atlântica da Ilha de Santa Catarina;
- Descrever os morfotipos de ECMs da família Russulaceae ocorrentes em áreas de Mata Atlântica da Ilha de Santa Catarina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A Ilha de Santa Catarina está localizada no litoral sul do Brasil, no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. As coletas foram realizadas em incursões aleatórias em parques e trilhas da região, sempre com autorização de coleta dos órgãos FLORAM (Fundação Municipal do Meio Ambiente), IMA (Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina) e ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). O município de Florianópolis tem cerca de 54 km de comprimento (norte-sul) e 18 km de largura (leste-oeste), totalizando 420 km². Partes da Ilha são cobertas por remanescentes da Mata Atlântica com áreas de Floresta Ombrófila Densa, incluindo os biomas manguezal, restinga e floresta (Greco *et al.*, 2017).

3.2 COLETA DE BASIDIOMAS

As coletas foram realizadas aleatoriamente no mês de outubro de 2018 a abril de 2019. Os basidiomas de Russulaceae foram coletados e fotografados em campo e descritos macroscopicamente para confirmar a identificação da família ou ao nível de gênero. A coleta foi feita com o auxílio de canivete e os basidiomas acondicionados em caixas plásticas organizadoras. Para confirmação da identificação dos cogumelos em Russulaceae foram realizadas observações dos esporos em reagente de Melzer. Os esporos de Russulaceae são facilmente diagnosticados pela ornamentação amilóide.

3.3 COLETA DE RAÍZES

Amostras de solo e raízes foram coletadas cerca de 20 cm de profundidade abaixo dos basidiomas. A coleta foi feita com auxílio de uma pá e o material foi armazenado em sacos plásticos. As amostras foram lavadas com peneiras para retirar o excesso de solo e separar as raízes. Posteriormente, em laboratório as raízes foram lavadas e observadas em microscópio estereoscópico para buscar as ECMs. As ECMs foram detectadas pela presença de manto. As ECMs foram então morfotipadas, codificadas e acondicionadas em tubos contendo glutaraldeído 2,5 %, armazenados em geladeira (2 °C a 4 °C). Uma parcela de cada

amostra foi acondicionada em tubos contendo álcool 70 % e armazenada em freezer, para ser estudada morfológicamente e sequenciada.

3.4 ANÁLISE DOS MATERIAIS

As análises micromorfológicas e macromorfológicas dos basidiomas e das ECMs foram realizadas no Laboratório de Micologia (MICOLAB) e no Laboratório de Microscopia Anatômica, localizados no departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os basidiomas coletados receberam um número de coletor e foram também fotografados em laboratório logo após a coleta, para registrar detalhes da macromorfologia. Os basidiomas foram desidratados em secadora de frutas por 24 horas sob temperatura de até 40 °C (Largent *et al.*, 1977). Os espécimes desidratados foram acondicionados em sacos plásticos (ziplock) devidamente identificados. Os espécimes desidratados foram colocados em freezer a - 20 °C antes de serem incorporados ao Fungário FLOR da UFSC. Fragmentos dos basidiomas ainda frescos, foram armazenados em sílica para serem usados na extração de DNA.

As raízes coletadas foram lavadas e triadas sob microscópio estereoscópico. As pontas de ECMs foram acondicionadas em tubos (tipo Eppendorf com glutaraldeído 2,5%) em geladeira (para preservação da morfologia) e em tubos tipo Eppendorf com álcool 70% em freezer (extração de DNA e sequenciamento da região ITS para BLAST e análises moleculares).

3.4.1 Estudos morfológicos

A descrição das características macro e microscópicas para a identificação ao nível de gênero dos basidiomas foi realizada com os basidiomas ainda frescos seguindo metodologia tradicionalmente utilizada para a identificação de cogumelos (Largent, 1986; Largent, 1977) e utilizando chaves e literatura específica para Russulaceae (Buyck, 2008; Verbeken *et al.*, 2014; Duque-Barbosa, 2016). Em alguns casos, como o de materiais fornecidos por colaboradores, a descrição macroscópica foi utilizando fotografias do material fresco com escala. Como referência de cores foi usado o Online Auction Color Chart (Kramer, 2004).

As ECMs foram fotografadas em água (Agerer, 1991) para registro e descrição da morfologia, cor e dimensão.

As descrições macro e micromorfológicas das ECMs seguiram a metodologia de Agerer (1987 - 1991). A descrição macroscópica foi realizada sob microscópio estereoscópico. As ECM foram cortadas a mão livre e observadas e descritas sob microscópio óptico, com observação da superfície do manto e da rede de Hartig.

3.5 ESTUDOS MOLECULARES

Para a identificação molecular dos parceiros envolvidos nas simbioses foram utilizadas as regiões ITS (*internal transcribed spacer* do rDNA) específicas para fungos e para plantas.

Para os basidiomas, a etapa de extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Doyle & Doyle (1987) modificado por Góes-Neto *et al.* (2005). A região ITS foi amplificada utilizando os primers ITS1F e ITS4, desenvolvidos para fungos (White *et al.*, 1990; Gardes *et al.*, 1993). O volume final da reação utilizando o produto da extração dos basidiomas foi de 25 μ L: 5 μ L do 5x FIREPol Master mix; 1 μ L de cada primer (10 pMol); 15 μ L de água e 3 μ L de DNA. O programa usado no termociclador teve a desnaturação inicial (2 min 94 °C) seguida de 40 ciclos de anelamento (30 s a 94 °C; 45 s a 55 °C; 1 min a 72 °C) e uma extensão final (7 min a 72 °C) (Apêndice D).

Para as ECMs foram separadas amostras em tubos tipo Eppendorfs e colocadas em vórtex (para retirar o excesso de solo adsorvido). Após, foram armazenadas em álcool 70% em freezer. Foi utilizada a metodologia de PCR direta, segundo Iotti e Zambonelli (2006). A região ITS foi amplificada utilizando os primers ITS1F e ITS4, desenvolvidos para fungos (White *et al.*, 1990; Gardes *et al.*, 1993). O volume final da reação de PCR direta foi de 50 μ L: 10 μ L do 5x FIREPol Master mix; 2 μ L de cada primer (10 pMol); 30 μ L de água, 2 μ L de BSA e 4 μ L de DNA. O programa usado no termociclador seguiu uma desnaturação inicial (6 min a 95 °C), 30 ciclos de anelamento (30 s a 94 °C; 30 s a 55 °C; 1 min a 72 °C) e uma extensão final (10 min a 72°C).

Para a extração do DNA da planta simbiote, foi utilizado o protocolo segundo Doyle & Doyle (1987) e Kumar *et al.* (2003) (Apêndice B). Foram utilizadas porções das raízes que não estavam cobertas por manto, para evitar que o DNA fúngico interferisse na extração do DNA da planta. A partir do DNA total extraído das raízes sem ECM, a região ITS da planta simbiote foi amplificada usando os primers ITS-u1/ITS-u2 (Cheng *et al.*, 2015) específicos para plantas para identificar as possíveis plantas ectomicorrízicas ao nível

de família. O volume final da reação utilizando produtos da extração foi de 25 μL : 5 μL do 5x FIREPol Master mix; 1 μL de cada primer (10 pMol); 14 μL de água; 1 μL de BSA e 3 μL de DNA. O programa usado no termociclador teve uma desnaturação inicial (2 min a 94 °C) seguida de 30 ciclos de anelamento (1 min a 94 °C; 1 min a 50 °C; 1,5 min a 72 °C) e uma extensão final (4 min a 72 °C). Foi realizada a eletroforese com todos os produtos de PCR e observados em gel de agarose 1% e purificados usando o protocolo de polietileno glicol (PEG) (Apêndice F).

As extrações do DNA e as amplificações da região ITS foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC. O sequenciamento foi realizado na Rede de Plataformas Fiocruz do Centro de Pesquisas Renée Rachou, Myleus Biotecnologia e LAMEB/UFSC. As sequências obtidas a partir das ECMs, dos basidiomas e das raízes sem manto foram comparadas com sequências depositadas em bancos de dados online, como o Genbank e o UNITE, e com coleção de sequências do Micolab - UFSC, através da plataforma online BLAST.

A árvore filogenética que melhor explicou os dados foi construída a partir da matriz que inclui sequências de fungos obtidas neste estudo ou outros projetos do Micolab, assim como sequências de outros táxons obtidas a partir do GenBank, UNITE e de colaboradores. As sequências foram curadas e alinhadas no Geneious R9 (Kearse *et al.*, 2012) utilizando o software Mafft (Kato *et al.*, 2013). O modelo de substituição nucleotídico utilizado foi gerado pelo modelo jModelTest v2.1.6 (Darriba *et al.*, 2012) e a análise de inferência bayesiana foi realizada utilizando o modelo MrBayes (Ronquist *et al.*, 2012) na plataforma CIPRES Science Gateway. (Miller *et al.*, 2010). Os Os grupos externos escolhidos foram *Bondarzewia montana* e *Stereum hirsutum* (Buyck *et al.*, 2008). A árvore foi editada no FigTree v1.0.4.

4 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão organizados em capítulo único (4.2), intitulado: **Novos registros de ectomicorrizas da família Russulaceae na Mata Atlântica da Ilha de Santa Catarina**. Será submetido para a revista *Mycological Progress*.

Neste capítulo será apresentada a morfologia e os parceiros simbióticos das ECMs coletadas na Mata Atlântica da Ilha de Santa Catarina.

4.1 RESULTADOS GERAIS

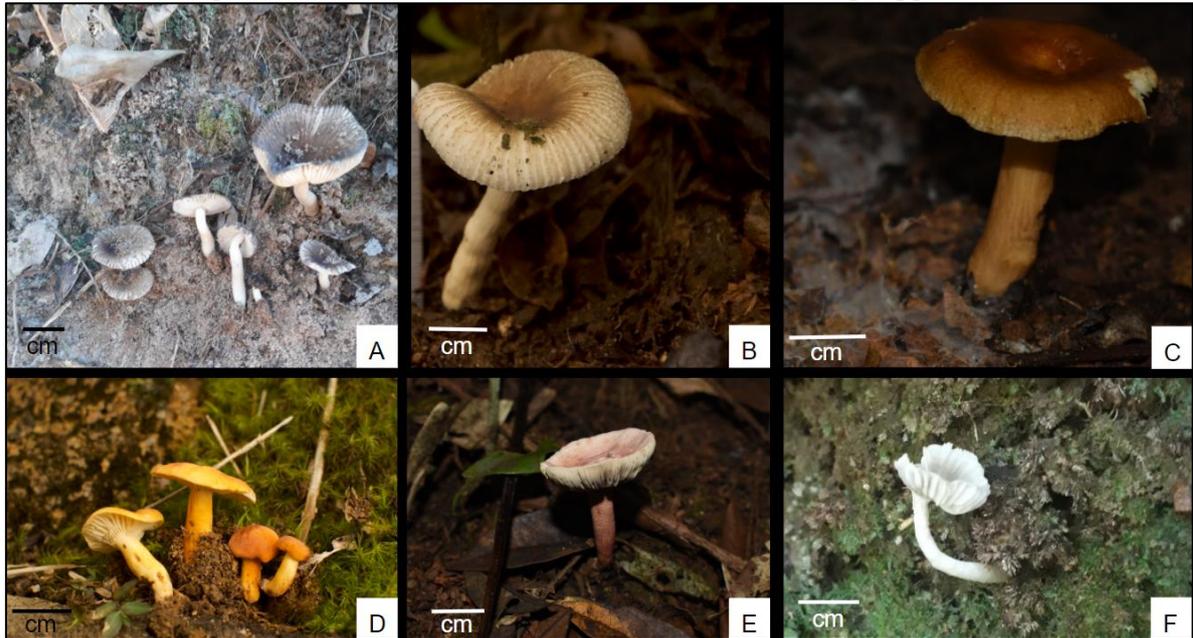
Foram coletados 27 basidiomas da família Russulaceae, pertencentes a gêneros potencialmente ectomicorrízicos. Dentre os gêneros coletados estão 14 basidiomas de *Lactifluus* pertencentes a 3 espécies, e 13 basidiomas de *Russula*, pertencentes a 3 espécies. A tabela 1 lista os táxons encontrados durante esse trabalho e a figura 1 apresenta imagens de algumas das espécies.

Tabela 1 - Basidiomas ectomicorrízicos em diferentes localidades da Ilha de Santa Catarina.

| Táxon | Coleta | Localidade | Data |
|---|---------------|------------------------------------|-------------|
| <i>Lactifluus catarinensis</i> J. Duque, M.A. Neves & M. Jaeger | TKC230 | Morro da Lagoa | 09/11/2018 |
| | CCG045 | Morro da Lagoa | 17/01/2019 |
| | CCG046 | Morro da Lagoa | 17/01/2019 |
| | CCG073 | Morro da Lagoa | 05/04/2019 |
| | CCG015 | Morro da Lagoa | 03/10/2018 |
| | CCG074 | Morro da Lagoa | 05/04/2019 |
| <i>Lactifluus panuoides</i> (Singer) De Crop | CCG004 | Trilha de Naufragados | 20/03/2018 |
| | CCG007 | Trilha de Naufragados | 01/05/2018 |
| | CCG063 | Naufragados | 13/02/2019 |
| <i>Lactifluus</i> sp. | MAN1302 | Sertão do Ribeirão - Morro do Peri | 11/11/2018 |
| <i>Lactifluus</i> sp. | CCG047 | Morro da Lagoa | 17/01/2019 |
| <i>Lactifluus</i> sp. | CCG049 | Morro da Lagoa | 17/01/2019 |
| <i>Lactifluus</i> sp. | CCG067 | Morro da lagoa | 15/03/2019 |

| | | | |
|---|---------|---|------------|
| <i>Lactifluus</i> sp. | CCG068 | Morro da lagoa | 15/03/2019 |
| <i>Lactifluus</i> sp. | LF25 | Morro da Lagoa | 22/04/2019 |
| <i>Lactifluus</i> sp. | CCG071 | Morro da Lagoa | 05/04/2019 |
| <i>Lactifluus</i> sp. | CCG072 | Morro da Lagoa | 05/04/2019 |
| <i>Russula puiggarii</i> (Speg.) Singer | CCG016 | Morro da Lagoa | 03/10/2018 |
| | CCG018 | Trilha do pântano do sul - Lagoinha do leste | 25/10/2018 |
| | CCG019 | Trilha do pântano do sul - Lagoinha do leste | 25/10/2018 |
| | CCG020 | Santo Amaro – Hotel | 08/11/2018 |
| | CCG064 | Trilha pântano do sul - Lagoinha do leste | 22/02/2019 |
| | CCG065 | Morro da lagoa | 15/03/2019 |
| | CCG066 | Morro da Lagoa | 15/03/2019 |
| | CCG070 | Morro da Lagoa | 05/04/2019 |
| | MCS062 | Morro da Lagoa | 17/01/2019 |
| <i>Russula rubropunctatissima</i> J.L. Cheype & E. Campo | CCG069 | Morro da Lagoa | 05/04/2019 |
| <i>Russula</i> sp. | CCG008 | Lagoa do Peri | 12/05/2018 |
| <i>Russula</i> sp. | MAN1265 | Trilha do Matadeiro - Lagoinha do leste | 01/06/2018 |
| <i>Russula</i> sp. | CCG075 | Lagoa do Peri | 03/05/2019 |

Figura 1 - Registros dos basidiomas ectomicorrízicos. A) *Russula* sp. – CCG008, B) *Russula puiggarii* – CCG016, C) *Lactifluus* sp. – CCG068, D) *Lactifluus catarinensis* – CCG015, E) *Russula rubropunctatissima* – CCG069, F) *Russula puiggarii* – CCG064.



Fotos: Ariadne Furtado (D), Carina C. Genebra (A e F) e Lara Ferst (B, C e E), 2019.

Dentre os basidiomas coletados, 26 foram sequenciados utilizando marcador ITS específico para fungos, seguindo os protocolos de extração, amplificação e purificação.

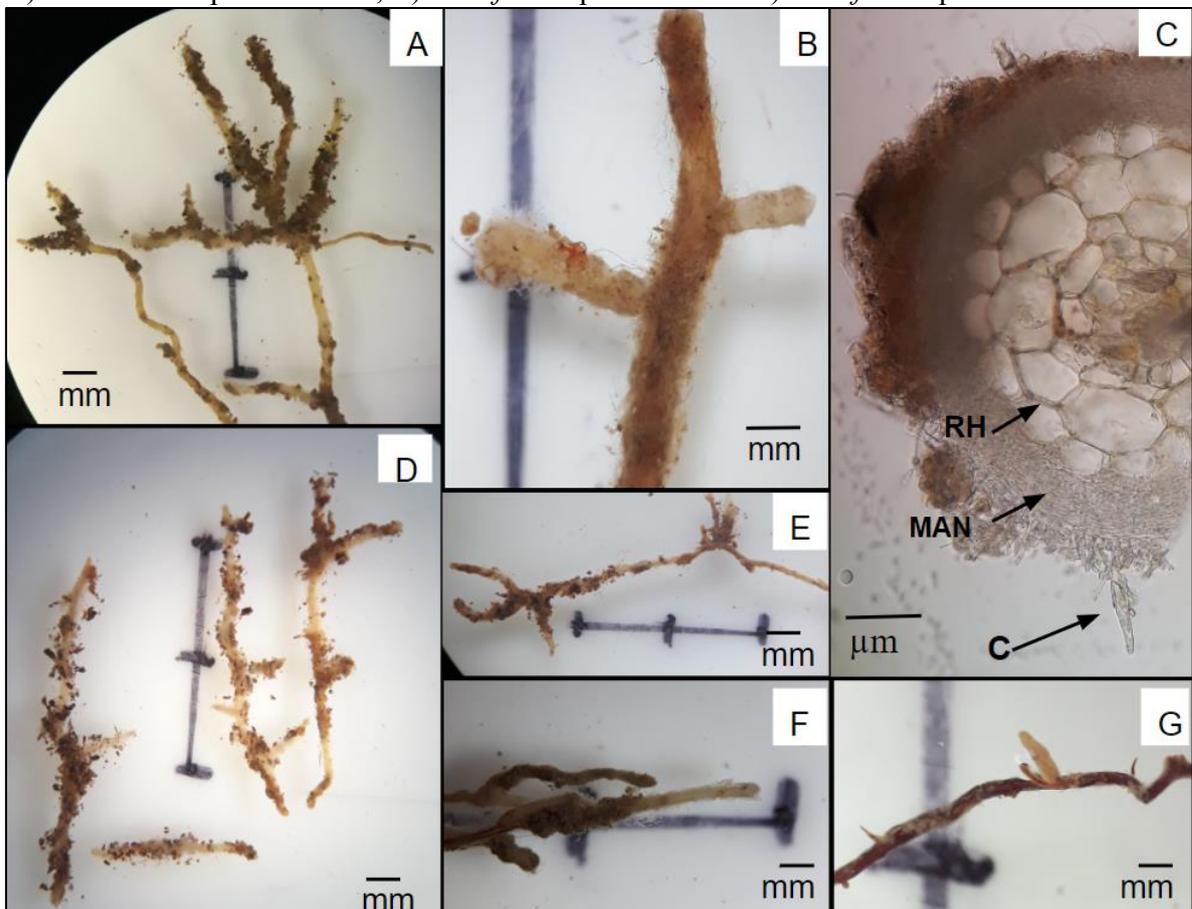
Foram analisadas 28 amostras de solo coletadas abaixo de basidiomas, sendo que 106 amostras de ECMs foram encontradas e separadas em 44 morfotipos. Dos morfotipos de ECMs encontrados, 23 foram sequenciados, mas apenas 12 resultaram em sequências de qualidade, sendo oito pertencentes ao gênero *Tomentella*, três ao gênero *Lactifluus* e uma ao gênero *Russula*.

Os táxons encontrados estão listados na tabela 2 e a figura 2 ilustra a diversidade de ECMs encontradas.

Tabela 2 - Fungos associados a raízes (ECM) em diferentes localidades da Ilha de Santa Catarina.

| Fungo | Coleta | Localidade | Data |
|--------------------------------|---------|-------------------------------------|------------|
| <i>Tomentella</i> sp. | R13M10 | Trilha do Pântano do sul – Lagoinha | 25/10/2018 |
| <i>Tomentella</i> sp. | R52M24 | Morro da Lagoa | 17/01/2019 |
| <i>Russula</i> sp. | R54M25 | Trilha do Pântano do sul – Lagoinha | 22/02/2019 |
| <i>Tomentella</i> sp. | R59M36 | Morro da Lagoa | 15/03/2019 |
| <i>Tomentella</i> sp. | R63M35 | Morro da Lagoa | 15/03/2019 |
| <i>Lactifluus</i> sp. | R65M36 | Morro da Lagoa | 15/03/2019 |
| <i>Tomentella</i> sp. | R67M36 | Morro da Lagoa | 15/03/2019 |
| <i>Lactifluus catarinensis</i> | R93M23 | Morro da Lagoa | 05/04/2019 |
| <i>Tomentella</i> sp. | R96M23 | Morro da Lagoa | 05/04/2019 |
| <i>Lactifluus catarinensis</i> | R102M23 | Morro da Lagoa | 05/04/2019 |

Figura 2 - ECMs morfotipadas. A) R61M34, B) R24M23, C) Corte em microscópio óptico do morfotipo R24M23, onde é possível observar rede de Hartig (RH), manto (MN) e cistídio, D) *Tomentella* sp. - R67M36, E) *Lactifluus* sp. - R65M36 F) *Lactifluus* sp. - R92M23.



Fotos: Carina C. Genebra, 2019.

As descrições dos morfotipos da família Russulaceae identificados através do sequenciamento são apresentadas abaixo e os demais morfotipos não descritos aqui estão incluídos no capítulo 1.

Morfotipo 1

ECM: *Russula* sp. - R54M25 (Figura 2 - G)

Micobionte: *Russula puiggarii* - CCG064 (Figura 1 - F)

Fitobionte: não identificado

Raiz com fragmentos de manto ao longo de toda extremidade, presença de uma única ponta micorrizada por raiz, não ramificada. Micorriza com 1–9 mm de comprimento e 0,3 mm de largura. Coloração creme (oac855, oac847) e aspecto velutíneo. Ausência de micélio extraradicular. Látex ou fluidos ausentes quando a ECM é cortada.

Morfotipos 2

ECM: *Lactifluus* sp. - R65M36 (Figura 2 - E)

Micobionte: *Lactifluus* sp. - CCG068 (Figura 1 - C)

Fitobionte: não identificado

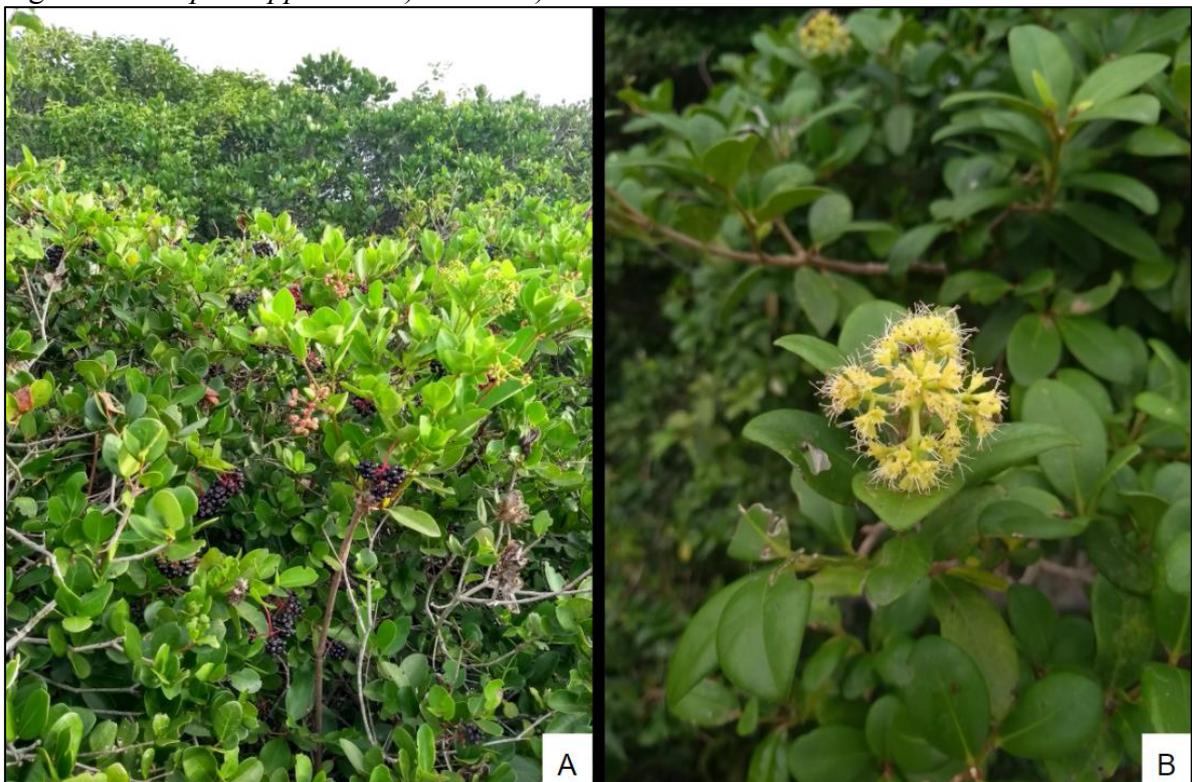
Raiz coberta por micélio, com solo aderido por toda extremidade e não ramificada. Micorriza com 3,5–4 mm de comprimento e 1,2 mm de largura. Coloração branca (oac851, oac809) e aspecto velutíneo. Presença de micélio extraradicular transparente. Látex ou fluidos ausentes quando a ECM é cortada.

Foram coletadas 28 amostras de solo com raízes. Em 106 pontas de raízes foi observada a presença de manto. Foram feitas extrações de DNA de 35 raízes, usando ITS específico para plantas. No entanto o sucesso de amplificação e sequenciamento foi muito baixo e apenas 3 resultaram em sequências de qualidade. A tabela 3 lista os simbiontes encontrados durante esse trabalho e a figura 3 ilustra uma das espécies identificada molecularmente, *Guapira opposita* (Vell.) Reitz.

Tabela 3 - Simbiontes ectomicorrízicos (plantas) em diferentes localidades da Ilha de Santa Catarina.

| Fitobionte | Coleta | Local | Data |
|---|---------------|-----------------------|-------------|
| <i>Guapira opposita</i> (Nyctaginaceae) | R93 | Morro da Lagoa | 05/04/2019 |
| <i>Guapira</i> sp. (Nyctaginaceae) | R102 | Morro da Lagoa | 05/04/2019 |
| <i>Dalechampia</i> sp. (Euphorbiaceae) | R106 | Trilha de Naufragados | 17/05/2019 |

Figura 3 - *Guapira opposita*. A) Frutos B) Inflorescência.



Fotos: Marivane Celmer Slodkowski, 2019.

4.2 CAPÍTULO 1

Ectomicorriza de *Lactifluus catarinensis* em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. na Mata Atlântica da Ilha de Santa Catarina

Carina Czerencha Genebra^{1*}; Duane Fernandes de Souza Lima¹; Aída Marcela Vasco Palácio²; Maria Alice Neves¹.

¹*Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.*

²*Grupo de Microbiología Ambiental – Grupo BioMicro, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, UdeA, Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia. Asociación Colombiana de Micología.*

RESUMO

Lactifluus (Pers.) Roussel (Russulaceae Losty) é um gênero ectomicorrízico que tem distribuição na África, Ásia e na região Neotropical. Neste trabalho investigamos espécies de *Lactifluus* associadas a plantas nativas da Mata Atlântica. O estudo foi realizado em remanescentes de Mata Atlântica situados em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Foram realizadas coletas de basidiomas, de solo e raízes abaixo deles. Os basidiomas e as ectomicorrizas (ECMs) encontrados foram descritos macro e microscopicamente. Para a identificação e confirmação molecular dos simbiontes (fungo, planta e ECM) foi usada a região ITS (*internal transcribed spacer* do rDNA) específica para fungos e para plantas. Foram coletados 14 basidiomas pertencentes a *Lactifluus*, incluindo *Lactifluus panuoides*, *L. catarinensis* e *Lactifluus* sp. As ECMs coletadas foram separadas em 44 morfotipos. Duas ECMs foram identificadas como sendo *Lactifluus catarinensis* associado com *Guapira opposita* (Nyctaginaceae), um registro inédito para a Mata Atlântica.

Palavras-chave: Brasil. Neotropical. Nyctaginaceae. Relações ectomicorrízicas. Russulaceae.

Introdução

Ectomicorrizas (ECMs) são associações simbióticas mutualistas entre fungos e raízes de plantas. Essas associações podem ser formadas em cerca de 6.000 espécies de fungos, incluindo membros de Boletales, Gomphales, Thelephorales, Amanitaceae, Cantharellaceae, Cortinariaceae, Russulaceae e Tricholomataceae (Agerer, 2006; Janowski *et al.*, 2019). As plantas simbiontes são de diversas famílias e ordens de gimnospermas e

angiospermas, dentre eles Pinaceae, Araucariaceae, Cupressaceae, Dipterocarpaceae, Gnetaceae, Polygonaceae, Nyctaginaceae, Myrtaceae, Salicaceae, Fabaceae, Fagales, Malvales e Moraceae (Landeweert *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006; Verbeken & Nuytinck, 2013; Vanegas-León, 2017).

Russulaceae Lotsy (Russulales, Basidiomycota) inclui fungos ectomicorrízicos, sendo o grupo de cogumelos com maior número de registros dessa simbiose (Looney *et al.*, 2018). Os gêneros ectomicorrízicos que compreendem Russulaceae são *Russula* Pers., *Lactarius* Pers., *Lactifluus* (Pers.) Roussel e *Multifurca* Byuck & Hofstetter. Esses gêneros têm sido bastante estudados na Europa e América do Norte, e mais recentemente na América Central e África. Algumas espécies foram encontradas associadas a raízes de Fabaceae Lindl., Nyctaginaceae Juss. e Polygonaceae A. Juss. na região amazônica da Venezuela, Brasil, Equador e Colômbia (Buyck *et al.*, 2008; Vanegas-León, 2017; Buyck *et al.*, 2018; Vasco-Palacios *et al.*, 2018).

Lactifluus (Pers.) Roussel é ectomicorrízico, com cerca de 200 espécies descritas, é monofilético e está atualmente dividido em quatro subgêneros: *L.* subg. *Lactariopsis*, *L.* subg. *Lactifluus*, *L.* subg. *Pseudogymnocarpi* and *L.* subg. *Gymnocarpi*. Sua distribuição ocorre nos trópicos, principalmente na África, Ásia e região Neotropical. Estima-se que a diversidade de *Lactifluus* seja maior do que conhecemos atualmente, porque na região neotropical há poucos especialistas e poucas coletas (Crop *et al.*, 2017; Dierickx *et al.*, 2019; Delgat *et al.*, 2020). Duque-Barbosa *et al.* (2020), descreveu novas espécies para o sul do Brasil: *Lactifluus catarinensis* J. Duque, M.A. Neves & M. Jaegger e *Lactifluus marielleae* J. Duque & M.A. Neves.

Nyctaginaceae Juss. é uma das famílias de plantas que forma associação ectomicorrízica com membros de *Lactifluus*. Esta família possui cerca de 30 gêneros. Na região neotropical, encontram-se principalmente os gêneros *Neea*, *Guapira* e *Pisonia* (Marchioretto *et al.*, 2011), podendo ser arbustos e árvores, com porte pequeno a médio.

O gênero *Guapira* possui registros em diversas regiões do Brasil. Na região sul, *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. é uma espécie comum, frequentemente encontrada em regiões de dunas costeiras (restinga), e tem grande importância na manutenção das espécies nativas. Auxilia na regeneração de plantas de restinga, pois beneficia plantas em estágio de germinação e ajuda na sobrevivência das plântulas. Sendo assim, ela é considerada uma planta nucleadora, que contribui na sucessão vegetacional, formando núcleos que promovem

o crescimento da vegetação através do acúmulo de umidade e sombreamento (Dalotto *et al.*, 2018; BFG, 2015).

Material e métodos

Área de estudo e amostragem

A área de estudo está localizada no litoral sul do Brasil, no município de Florianópolis, Santa Catarina, em um remanescente de Mata Atlântica. As coletas aleatórias foram realizadas no Morro da Lagoa da Conceição, no mês de outubro de 2018 a abril de 2019.

Análise das pontas de raízes e basidiomas

As análises micromorfológicas e macromorfológicas dos basidiomas e das ECMs foram realizadas no Laboratório de Micologia (MICOLAB) e no Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG), ambos localizados no departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Brasil.

As raízes foram coletadas abaixo dos basidiomas, nas porções de até 20 cm de profundidade de solo, sem serapilheira. Os basidiomas também foram coletados. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e depois armazenadas em geladeira. Em laboratório, as raízes foram lavadas em peneiras para retirar o excesso de solo. Para verificar a presença das ECMs, as raízes limpas foram observadas em microscópio estereoscópico, sendo reconhecidas devido à presença de manto.

As ECMs foram fotografadas em água (Agerer, 1991) para registro da morfologia, cor e dimensão. A morfotipagem e descrição foi feita segundo Agerer (1987 - 1991). As ECMs foram acondicionadas em tubos tipo Eppendorf com glutaraldeído 2,5% para preservação da morfologia, e em tubos tipo Eppendorf com álcool 70% para extração de DNA.

Os basidiomas foram desidratados segundo Largent *et al.*, (1977), e um fragmento foi armazenado em sílica para ser utilizado nas análises moleculares. A confirmação das características macroscópicas e microscópicas (Largent, 1986; Largent, 1977) para a identificação dos basidiomas foi realizada utilizando chaves de identificação e literatura específica para Russulaceae (Buyck, 2008; Verbeken *et al.*, 2014; Duque-Barbosa, 2016, Duque-Barbosa, 2020). Os espécimes serão posteriormente incorporados ao fungário FLOR, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Extração do DNA

A identificação molecular dos parceiros envolvidos nas simbioses foi realizada utilizando as regiões ITS (*internal transcribed spacer* do rDNA) específicas para fungos e para plantas. O DNA dos basidiomas foi extraído de acordo com a literatura, seguindo o protocolo de Doyle & Doyle (1987) modificado por Góes-Neto *et al.*, (2005). Para as ECMs foi utilizado o protocolo de PCR direta segundo Iotti e Zambonelli (2006). A região ITS dos fungos (basidiomas e ECM) foi amplificada utilizando os primers ITS1F e ITS4 desenvolvidos para fungos (White *et al.*, 1990; Gardes *et al.*, 1993).

A extração do DNA da planta simbiote foi realizada segundo o protocolo de Doyle & Doyle (1987) e Kumar *et al.* (2003) e foram utilizadas porções das raízes sem manto. Para a amplificação da região ITS da planta simbiote foram usados os primers ITS-u1/ITS-u2 (Cheng *et al.*, 2015).

Os produtos de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% e a purificação foi realizada com o protocolo de polietilenoglicol (PEG) (Apêndice F). Essas etapas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC). O sequenciamento foi realizado na Rede de Plataformas Fiocruz do Centro de Pesquisas Renée Rachou, Myleus Biotecnologia e LAMEB/UFSC. As sequências obtidas serão incorporadas ao Genbank.

Análise filogenética

As sequências obtidas a partir das ECMs, dos basidiomas e da planta simbiote foram editadas no Geneious R9 (Kearse *et al.*, 2012) e confrontadas com sequências do Genbank e UNITE.

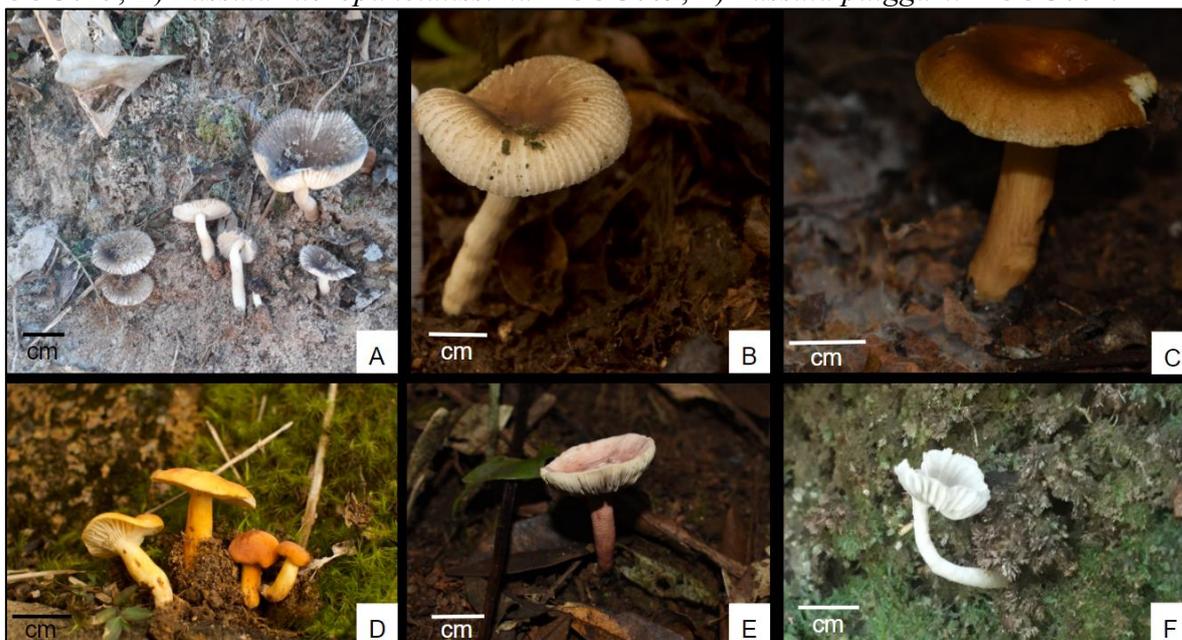
A árvore filogenética que melhor explicou os resultados foi construída a partir da matriz de sequências obtidas neste estudo e sequências de outros táxons obtidas a partir do GenBank, UNITE e do banco de dados do Micolab – UFSC. As sequências foram curadas e alinhadas em Geneious R9 utilizando Mafft (Katoh *et al.*, 2013). As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se critérios de inferência Bayesiana utilizando MrBayes v3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2012) e o modelo de substituição nucleotídico utilizado foi gerado pelo modelo jModelTest v2.1.6 (Darriba *et al.*, 2012), disponíveis na plataforma CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010). Os grupos externos escolhidos foram *Bondarzewia montana* e *Stereum hirsutum* (Buyck *et al.*, 2008). A árvore foi editada em FigTree v1.0.4.

Resultados e Discussão

A Mata Atlântica é um bioma predominante em Santa Catarina (Gotardo *et al.*, 2019). Nesse trabalho foi identificada a relação simbiótica entre um fungo e uma planta nativa dessa região, foram coletados 27 basidiomas da família Russulaceae e amostras de solo com raiz. As coletas aconteceram aleatoriamente entre março de 2018 e abril de 2019.

Analizamos 106 raízes coletadas abaixo de basidiomas (Figura 1a) que possuíam ECMs, e estas foram classificadas em 44 morfotipos. Foram obtidas sequências de 14 basidiomas e três de raízes com ECMs pertencentes ao gênero *Lactifluus*, além de três raízes sem manto, sendo duas de *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) (gênero de planta já conhecido como ectomicorrízico), e uma de *Dalechampia* (Euphorbiaceae).

Figura 1a - Basidiomas ectomicorrízicos. Florianópolis – SC. A) *Russula* sp. – CCG008, B) *Russula puiggarii* – CCG016, C) *Lactifluus* sp. – CCG068, D) *Lactifluus catarinensis* – CCG015, E) *Russula rubropunctatissima* – CCG069, F) *Russula puiggarii* – CCG064.



Fotos: Ariadne Furtado (D), Carina C. Genebra (A e F) e Lara Ferst (B, C e E), 2019.

Para a confirmação da posição filogenética dos espécimes fúngicos foram incluídas sequências retiradas do Genbank e utilizou-se o modelo de substituição nucleotídico GTR+G na análise de inferência Bayesiana, resultando na árvore filogenética apresentada na Figura 2a. Os resultados mostraram que os táxons coletados foram *Lactifluus catarinensis* (Figura 3a), *Lactifluus* sp., *L. panuoides*, *Russula puiggarii*, *R. rubropunctatissima* e *Russula* sp. (Figura 1a). Nosso resultado mostrou que existe grande diversidade *Lactifluus* presente em

regiões de Mata Atlântica, corroborando com os dados que já haviam sido publicados por Duque-Barbosa (2020).

Duas das ECMs encontradas pertencem à espécie *L. catarinensis* (Figura 3a), e foram encontradas sob basidiomas dessa mesma espécie (R93M23 e R102M23). As sequências das ECMs e dos basidiomas aparecem próximas na árvore filogenética da Figura 2a, que também nos mostra que o clado desse táxon é o que tem maior abundância de sequências. Outro táxon de *Lactifluus* foi sequenciado a partir de basidioma e da ECM (CCG068 e R65M36) porém foram encontrados poucos espécimes e não foi possível identificar a planta simbiote.

ECM: *Lactifluus* sp. - R93M23 (Figura 3a - C) e R102M23 (Figura 3a - D)

Micobionte: *Lactifluus catarinensis* - CCG073 (Figura 3a - A) e CCG074 (Figura 3a - B)

Fitobionte: *Guapira opposita* - R93 e R102

Raiz coberta por micélio por toda a extremidade com solo aderido. Micorrizas com 1,5 – 0,8 mm e 0,7 – 0,3 mm de comprimento e 0,2 mm de largura. Coloração branca a creme (oac847) e aspecto velutíneo. Presença de micélio extraradicular. Látex ou fluidos ausentes quando a ECM é cortada.

Figura 3a - *Lactifluus catarinensis*. Florianópolis – SC. A) Basidioma em campo (CCG073), B) Basidioma em campo (CCG074), C) ECM sob microscópio estereoscópico (R93M23), D) ECM sob microscópio estereoscópico (R102M23).



Haug *et al.* (2004) descreveram ECMs de Russulaceae associadas a membros de Nyctaginaceae, com morfologias semelhantes às encontradas em nosso trabalho, confirmando o estado ectomicorrízico de ambas as famílias em regiões tropicais. *Guapira opposita* está amplamente distribuída no Brasil, incluindo em regiões da Mata Atlântica e

restinga (Dalotto, 2016). Dalotto *et al.* (2018) evidenciaram a importância da *G. opposita* como facilitadora e nucleadora na restinga, onde ela se encontra principalmente na forma arbustiva. O papel de plantas micorrízicas é evidenciado em regiões com solo pobre, pois plantas que realizam esse tipo de associação podem ter vantagens na competição com plantas não micorrízicas. A associação é importante também para a dinâmica da comunidade vegetal local, auxílio na manutenção e diversidade em um ambiente estressante, com nutrientes limitados, pouca disponibilidade de água no solo e altos níveis de salinidade, como a restinga. Atualmente, é cada vez mais reconhecido que as micorrizas podem ser utilizadas para desenvolver planos de restauração mais eficientes para habitats ameaçados (Guerrero-Galán *et al.*, 2019; Field *et al.*, 2020).

Na Mata Atlântica observamos que há a formação de ECMs em raízes de *G. opposita* com *Lactifluus catarinensis*, porém ainda não existem registros sobre a associação com outros simbiontes fúngicos. Durante um tempo as ECMs eram consideradas raras e/ou ausentes em florestas tropicais e os fungos ectomicorrízicos são pouco estudados (Corrales *et al.*, 2018). Por isso, é de grande importância que mais estudos sejam realizados, inclusive em áreas de Mata Atlântica, para que os planos de manejo e preservação da funga e da flora sejam mais eficientes e o potencial para futuros estudos seja ampliado, como por exemplo, conhecer melhor a anatomia, fisiologia e ecologia das relações e identificar quem são os parceiros simbiontes na região neotropical e subtropical e continuar a ampliar o conhecimento sobre a diversidade de Russulaceae nessas regiões (Nouhra *et al.*, 2019; Duque- Barbosa *et al.*, 2020).

REFERÊNCIAS

AGERER, R. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. 15 parts. Schwäbisch Gmünd: Einhorn-Verlag, 1987–1991.

AGERER, R. Characterization of ectomycorrhiza. In: Norris, J.R.; Read, D.J. & Varma, A.K. eds. *Methods in Microbiology: Techniques for the Study of Mycorrhiza*, v.23., San Diego, Academic Press, p. 25–73, 1991.

AGERER, Reinhard *et al.* Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological Progress*, v. 5, n. 2, p. 67-107, jun. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-006-0505-x>.

BFG 2015 - Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 04 mar. 2020.

BUYCK, B. *et al.* Walking the thin line between *Russula* and *Lactarius*: the dilemma of *Russula* subsect. Ochricompactae. *Fungal Diversity*, n. 28, p.15-40, 2008.

BUYCK, Bart *et al.* Walking the thin line... ten years later: the dilemma of above- versus below-ground features to support phylogenies in the Russulaceae (Basidiomycota). *Fungal Diversity*, v. 89, n. 1, p. 267-292, mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-018-0397-5>.

CHENG, Tao *et al.* Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, v. 16, n. 1, p. 138-149, 3 jul. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.12438>.

CORRALES, Adriana *et al.* Ectomycorrhizal associations in the tropics - biogeography, diversity patterns and ecosystem roles. *New Phytologist*, v. 220, n. 4, p. 1076-1091, 24 abr. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.15151>.

CROP, E. de; *et al.* A multi-gene phylogeny of *Lactifluus* (Basidiomycota, Russulales) translated into a new infrageneric classification of the genus. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 38, n. 1, p. 58-80, 30 jun. 2017. Naturalis Biodiversity Center. <http://dx.doi.org/10.3767/003158517x693255>.

DALOTTO, Cecilia Elena Sánchez *et al.* Fatores envolvidos no processo de facilitação pelo arbusto *Guapira opposita* em ambientes de restinga. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

DALOTTO, Cecilia e s *et al.* Facilitation influences patterns of perennial species abundance and richness in a subtropical dune system. *Plants*, v. 10, n. 2, 1 mar. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aobpla/ply017>.

DARRIBA, Diego *et al.* JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, v. 9, n. 8, p. 772-772, 30 jul. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2109>.

DELGAT, L. *et al.* *Lactifluus* (Russulaceae) diversity in Central America and the Caribbean: melting pot between realms. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 44, n. 1, p. 278-300, 29 jun. 2020. Naturalis Biodiversity Center. <http://dx.doi.org/10.3767/persoonia.2020.44.10>.

DIERICKX, Glen *et al.* Updated taxonomy of *Lactifluus* section Luteoli: *L. russulisporus* from Australia and *L. caliendrifer* from Thailand. *Myckeys*, v. 56, p. 13-32, 10 jul. 2019. Pensoft Publishers. <http://dx.doi.org/10.3897/myckeys.56.35204>.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L.. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemical Bulletin* v.19, p.11-15, 1987.

DUQUE-BARBOSA, Jaime Andrés. Análise filogenética de *Russula* pers. (Russulaceae, Russulales: Agaricomycetes). 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

DUQUE-BARBOSA, Jaime Andrés *et al.* A new section, *Lactifluus* section Neotropicus (Russulaceae), and two new *Lactifluus* species from the Atlantic Forest, Brazil. *Systematics and Biodiversity*, v. 18, n. 4, p. 347-361, 18 maio 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14772000.2020.1769221>.

FIELD, Katie J. *et al.* Mycorrhizas for a changing world: sustainability, conservation, and society. *Plants, People, Planet*, v. 2, n. 2, p. 98-103, 22 jan. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ppp3.10092>.

GARDES, M. *et al.* ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, v. 2, n. 2, p. 113-118, abr. 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>.

GÓES-NETO, A. *et al.* DNA extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas* v.18, n.2, p.19-32, 2005.

GOTARDO, Rafael *et al.* Comparação entre variáveis microclimáticas de local aberto e florestal em um bioma da Mata Atlântica, sul do Brasil. *Ciência Florestal*, v. 29, n. 3, p. 1415, 30 set. 2019. Universidade Federal de Santa Maria. <http://dx.doi.org/10.5902/1980509834832>.

GUERRERO-GALÁN, Carmen *et al.* Ectomycorrhizal symbiosis helps plants to challenge salt stress conditions. *Mycorrhiza*, v. 29, n. 4, p. 291-301, 22 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-019-00894-2>.

HAUG, Ingeborg *et al.* Russulaceae and Thelephoraceae form ectomycorrhizas with members of the Nyctaginaceae (Caryophyllales) in the tropical mountain rain forest of southern Ecuador. *New Phytologist*, v. 165, n. 3, p. 923-936, 15 dez. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01284.x>.

IOTTI, Mirco; ZAMBONELLI, Alessandra. A quick and precise technique for identifying ectomycorrhizas by PCR. *Mycological Research*, v. 110, n. 1, p. 60-65, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2005.09.010>.

JANOWSKI, Daniel *et al.* Effective Molecular Identification of Ectomycorrhizal Fungi: revisiting DNA isolation methods. *Forests*, v. 10, n. 3, p. 218, 1 mar. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/f10030218>.

KATOH, K. *et al.* MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, n. 4, p. 772-780, 16 jan. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst010>.

KEARSE, M. *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 27 abr. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.

- KUMAR, Anil *et al.* Extraction of high-molecular-weight DNA from dry root tissue of *Berberis lycium* suitable for RAPD. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 21, n. 3, p. 309-309, set. 2003. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/bf02772807>.
- LANDEWEERT, Renske *et al.* Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 16, n. 5, p. 248-254, maio 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-5347\(01\)02122-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-5347(01)02122-x).
- LARGENT, D. L., D. Johnson, *et al.* 1977. How to Identify Mushrooms to Genus III: Microscopic features. Eureka, Mad River Press Inc.
- LARGENT, D. L.. 1986. How to Identify Mushrooms to Genus I: Macroscopic features. Eureka, Mad River Press Inc.
- LOONEY, Brian P. *et al.* Russulaceae: a new genomic dataset to study ecosystem function and evolutionary diversification of ectomycorrhizal fungi with their tree associates. *New Phytologist*, v. 218, n. 1, p. 54-65, 30 jan. 2018. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/nph.15001>.
- MARCHIORETTO, Maria Salette *et al.* A FAMÍLIA NYCTAGINACEAE JUSS. NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL. *Pesquisas Botânica*, São Leopoldo, RS, n. 62, p. 129-162, jan. 2011.
- MILLER, Mark A. *et al.* Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. 2010 Gateway Computing Environments Workshop (Gce), nov. 2010. IEEE. <http://dx.doi.org/10.1109/gce.2010.5676129>.
- NOUHRA, Eduardo R. *et al.* Ectomycorrhizal Fungi in South America: their diversity in past, present and future research. *Fungal Biology*, p. 73-95, 2019. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-15228-4_4.
- RONQUIST, Fredrik *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, v. 61, n. 3, p. 539-542, 22 fev. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- VANEGAS-LEÓN, M. L. Ectomicorrizas tropicais: Estudos de caso na Mata Atlântica. 2017. 78 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.
- VASCO-PALACIOS, Aída M. *et al.* Ectomycorrhizal fungi diversity in a white sand forest in western Amazonia. *Fungal Ecology*, v. 31, p. 9-18, fev. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2017.10.003>.
- VERBEKEN, A. & Nuytinck, Jorinde. Not every milkcap is a *Lactarius*. *Scripta Botanica Belgica*. v.51, p.162-168, 2013.
- VERBEKEN, A. *et al.* Tales of the unexpected: angiocarpous representatives of the Russulaceae in tropical south east Asia. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of*

Fungi, v. 32, n. 1, p. 13-24, 30 jun. 2014. Naturalis Biodiversity Center.
<http://dx.doi.org/10.3767/003158514x679119>.

WANG, B. *et al.* Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, v. 16, n. 5, p. 299-363, 6 maio 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-005-0033-6>.

WHITE, T.J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J. & White, T.J. eds. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, p. 315–322, 1990.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As ECMs em regiões tropicais eram consideradas raras ou ausentes e os fungos ectomicorrízicos são pouco estudados (Corrales *et al.*, 2018). Visto isso, surgiu o grupo de pesquisas em ECMs da região Sul do Brasil, no laboratório de Micologia da UFSC (Micolab), que tem desenvolvido trabalhos em diferentes áreas, desde a taxonomia dos fungos e plantas envolvidos até a fisiologia e anatomia da simbiose e restauração e ecologia. Devido ao projeto estar no início, algumas etapas estão se estruturando, algumas dificuldades e aprendizados surgiram ao longo do desenvolvimento desse trabalho, como por exemplo, a forma de armazenamento das ECMs e a extração, amplificação e sequenciamento do DNA, que foram os principais desafios, por serem etapas que estavam sendo aprimoradas durante o desenvolvimento do projeto. Durante as coletas foram encontradas amostras de 106 ECMs nas pontas de raízes, separadas em 44 morfotipos, mas não foi possível identificar todas. Desse total 4 foram identificadas através do sequenciamento como ECMs de Russulaceae. A Tabela 2 e a Figura 2 mostram a diversidade de ECMs que foi encontrada ao durante a execução desse trabalho. São necessários mais estudos para conhecer a diversidade de ECMs na Mata Atlântica, entender suas funções, aprimorar e padronizar os protocolos.

No início, o armazenamento foi feito todo em glutaraldeído para fixar as ECMs (Leonardi *et al.*, 2016; Leonardi *et al.*, 2018). Porém, o mesmo impede que o material genético seja acessado para sequenciamento, isso deve acontecer devido à capacidade do glutaraldeído de penetrar nos tecidos (Abrahão *et al.*, 2004). Para minimizar esse problema os materiais foram então colocados em glutaraldeído (por 24h a 48h) e depois transferidos para álcool 70% ou PBS (Cordeiro & Lusa, comunicação pessoal). Em cortes anatômicos das ECMs (Figura 2) foi possível visualizar a presença de um manto, uma rede de Hartig e a presença de cistídios em um morfotipo, porém esse espécime não pôde ser identificado molecularmente.

Os estudos moleculares das raízes sem manto e dos basidiomas foram feitos em quatro etapas: extração, amplificação, purificação e sequenciamento. Com as ectomicorrizas foi realizada PCR direta (Iotti; Zambonelli 2006), purificação e sequenciamento. Os materiais mais difíceis de trabalhar e com os menores índices de sucesso foram as raízes sem manto. Havia pouca quantidade de material e não existem muitos protocolos padronizados para essa etapa. Com as ECMs foi feito *nested* PCR devido à pequena quantidade de material

genético amplificada. Mesmo tendo todos esses cuidados muitas vezes o sequenciamento não ficava com qualidade suficiente para ser utilizado.

As sequências ITS foram usadas na ferramenta BLAST do GenBank para confirmar a identificação molecular pelo menos ao nível de gênero. Táxons de *Russula* e *Lactifluus* foram encontrados, como era esperado (amostras R54M25, R65M36, R93M23 e R102M23). Também foram obtidas sequências a partir de ECMs que coincidiram com sequências de *Tomentella* (amostras R13M10, R52M24, R59M36, R63M35, R67M36, R93M23, R96M23). Em outros trabalhos *Tomentella* tem se mostrado diverso em regiões tropicais (Alvarez-Manjarrez *et al.*, 2015). Haug *et al.* (2004) confirmaram em seu trabalho a associação de membros de Russulaceae e Thelephoraceae com *Guapira*. Em nosso trabalho identificamos molecularmente raízes de *Guapira* (Nyctaginaceae) e *Dalechampia* (Euphorbiaceae) como simbiontes de fungos nas áreas coletadas, confirmando o estado ectomicorrízico dessas famílias, já observado por Agerer & Rambold (2004 - 2020). *Dalechampia* porém, é um gênero da família Euphorbiaceae possivelmente inédito para registros ectomicorrízicos, porém não foi possível a identificação do fungo simbionte através de análises moleculares, sendo necessárias mais coletas e mais estudos com espécimes desse gênero.

Durante muito tempo, os estudos da comunidade de fungos ectomicorrízicos nas regiões tropicais foram feitos quase exclusivamente baseados na presença de basidiomas. Com o avanço na biologia molecular e na morfotipagem tornou-se possível identificar micobiontes até mesmo em micorrizas que possuem apenas alguns milímetros de comprimento. No entanto, ainda não existem protocolos ou guias para a descrição ou determinação de ECMs tropicais. Além disso, tornou-se possível a identificação daqueles fungos que não produzem estruturas reprodutivas conspícuas, como por exemplo espécimes do gênero *Tomentella*, fato que muitas vezes impede a inclusão destas espécies em listas de fungos ectomicorrízicos conhecidos (Dahlberg, 2001). Embora sequências de *Tomentella* tenham sido encontradas durante esse trabalho, os basidiomas não foram observados nas expedições de campo (Kõljalg, 1996; Jakucs; Erős-Honti, 2008).

6 CONCLUSÃO

Em nosso trabalho foi possível confirmar associações ectomicorrízicas entre *Lactifluus catarinensis* e *Guapira opposita*, evidenciando a presença dessa associação simbiótica em regiões neotropicais. Os estudos com ECMs e o entendimento dessa associação em regiões neotropicais ainda é um desafio, pois ainda são muito recentes e não se sabe como, com quem e onde exatamente acontece essa associação. Por isso, tem sido de grande importância que estudos como esse sejam realizados nessas regiões.

Pesquisas em diversas áreas da biologia, como a fisiologia, anatomia, molecular, taxonomia e ecologia devem ser realizadas a fim de compreender melhor as associações ectomicorrízicas em regiões neotropicais e a sua importância para o meio ambiente. Esse trabalho sugere que existem ainda muitas espécies a serem descritas e que necessita de um melhor entendimento sobre as diferenças morfológicas das ECMs neotropicais quando comparadas com as ECM de regiões temperadas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, D. S. *et al.* Estudo comparativo com diversos fixadores para aplicação em microscopia eletrônica de transmissão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 63, n. 2, p. 248-254, 2004.
- AGERER, R. *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. 15 parts. Schwäbisch Gmünd: Einhorn-Verlag, 1987–1991.
- AGERER, R. Characterization of ectomycorrhiza. Em: Norris, J.R.; Read, D.J. & Varma, A.K. eds. *Methods in Microbiology: Techniques for the Study of Mycorrhiza*, v.23., San Diego, Academic Press, p. 25–73, 1991.
- AGERER, Reinhard *et al.* Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological Progress*, v. 5, n. 2, p. 67-107, jun. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-006-0505-x>.
- AGERER R. & RAMBOLD G. DEEMY – An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. www.deemy.de – München, Germany, 2004–2020.
- ALVAREZ-MANJARREZ, Julieta *et al.* *Tomentella brunneoincrustedata*, the first described species of the Pisonieae-associated Neotropical *Tomentella* clade, and phylogenetic analysis of the genus in Mexico. *Mycological Progress*, v. 15, n. 1, 28 dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-015-1152-x>.
- ALVAREZ-MANJARREZ, Julieta *et al.* Caryophyllales are the main hosts of a unique set of ectomycorrhizal fungi in a Neotropical dry forest. *Mycorrhiza*, v. 28, n. 2, p. 103-115, 27 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-017-0807-7>.
- BFG 2015 - Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 04 mar. 2020.
- BLACKWELL, Meredith *et al.* The Fungi: 1, 2, 3 :: 5.1 million species?. *American Journal of Botany*, v. 98, n. 3, p. 426-438, mar. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1000298>.
- BUYCK, B. *et al.* Walking the thin line between *Russula* and *Lactarius*: the dilemma of *Russula* subsect. *Ochricompactae*. *Fungal Diversity*, n. 28, p.15-40, 2008.
- BUYCK, Bart *et al.* Walking the thin line... ten years later: the dilemma of above- versus below-ground features to support phylogenies in the russulaceae (basidiomycota). *Fungal Diversity*, v. 89, n. 1, p. 267-292, mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-018-0397-5>.
- CHENG, Tao *et al.* Barcoding the kingdom Plantae: new pcr primers for rbcL regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, v. 16, n. 1, p. 138-149, 3 jul. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.12438>.

CORRALES, Adriana *et al.* Ectomycorrhizal associations in the tropics - biogeography, diversity patterns and ecosystem roles. *New Phytologist*, v. 220, n. 4, p. 1076-1091, 24 abr. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.15151>.

DARRIBA, Diego *et al.* JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, v. 9, n. 8, p. 772-772, 30 jul. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2109>.

DAHLBERG, Anders *et al.* Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytologist*, v. 150, n. 3, p. 555-562, jun. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00142.x>.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemical Bulletin* v.19, p.11-15, 1987.

DUQUE-BARBOSA, Jaime Andrés. Análise filogenética de *Russula* pers. (Russulaceae, Russulales: Agaricomycetes). 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

DUQUE-BARBOSA, Jaime Andrés *et al.* A new section, *Lactifluus* section Neotropicus (Russulaceae), and two new *Lactifluus* species from the Atlantic Forest, Brazil. *Systematics And Biodiversity*, v. 18, n. 4, p. 347-361, 18 maio 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14772000.2020.1769221>.

FREIRE, Cassio Geremia *et al.* First record of in vitro formation of ectomycorrhizae in *Psidium cattleianum* Sabine, a native Myrtaceae of the Brazilian Atlantic Forest. *Plos One*, v. 13, n. 5, 8 maio 2018. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0196984>.

GARDES, M. *et al.* ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, v. 2, n. 2, p. 113-118, abr. 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>.

GENRE, Andrea *et al.* Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, v. 18, n. 11, p. 649-660, 21 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0402-3>.

GÓES-NETO, A. *et al.* DNA extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas* v.18, n.2, p.19-32, 2005.

GRECO, Thiago Machado *et al.* Tribo Olyreae (Poaceae: bambusoideae) na ilha de santa catarina, brasil. *Rodriguésia*, v. 68, n. 2, p. 557-567, jun. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201768218>.

HAUG, Ingeborg *et al.* Russulaceae and Thelephoraceae form ectomycorrhizas with members of the Nyctaginaceae (Caryophyllales) in the tropical mountain rain forest of southern Ecuador. *New Phytologist*, v. 165, n. 3, p. 923-936, 15 dez. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01284.x>.

IOTTI, Mirco; ZAMBONELLI, Alessandra. A quick and precise technique for identifying ectomycorrhizas by PCR. *Mycological Research*, v. 110, n. 1, p. 60-65, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2005.09.010>.

JAEGER, M. C. W.. Diversidade de Russulaceae para o Brasil. 2013. 78 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

JAKUCS, Erzsébet; Erős-Honti, Zsolt. Morphological-anatomical characterization and identification of *Tomentella* ectomycorrhizas. *Mycorrhiza*, v. 18, n. 6-7, p. 277-285, 12 jul. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-008-0183-4>.

KATO, K. *et al.* MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, n. 4, p. 772-780, 16 jan. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst010>.

KEARSE, M. *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 27 abr. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.

KÖLJALG, Urmas. *Tomentella* (Basidiomycota) and Related Genera in Temperate Eurasia. Nova York: Fungiflora, 213 p, 1996.

Kramer, L. A. The online auction color chart. Online Auction Color Chart, 2004.

KUMAR, Anil *et al.* Extraction of high-molecular-weight DNA from dry root tissue of *Berberis lycium* suitable for RAPD. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 21, n. 3, p. 309-309, set. 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02772807>.

KUMAR, Jitender *et al.* Studies on Ectomycorrhiza: an appraisal. *The Botanical Review*, v. 84, n. 2, p. 108-155, 25 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12229-017-9196-z>.

LANDEWEERT, Renske *et al.* Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 16, n. 5, p. 248-254, maio 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-5347\(01\)02122-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-5347(01)02122-x).

LARGENT, D. L., D. Johnson, *et al.* 1977. How to Identify Mushrooms to Genus III: Microscopic features. Eureka, Mad River Press Inc.

LARGENT, D. L. How to Identify Mushrooms to Genus I: Macroscopic features. Eureka, Mad River Press Inc, 1986.

LEONARDI, Marco *et al.* Peering into the Mediterranean black box: *Lactifluus rugatus* ectomycorrhizas on cistus. *Ima Fungus*, v. 7, n. 2, p. 275-284, 10 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.5598/imafungus.2016.07.02.07>.

LEONARDI, Marco *et al.* *Scleroderma meridionale* ectomycorrhizae on *Halimium halimifolium*: expanding the mediterranean symbiotic repertoire. *Symbiosis*, v. 76, n. 2, p. 199-208, 8 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13199-018-0548-1>.

LOONEY, Brian P. *et al.* Russulaceae: a new genomic dataset to study ecosystem function and evolutionary diversification of ectomycorrhizal fungi with their tree associates. *New Phytologist*, v. 218, n. 1, p. 54-65, 30 jan. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.15001>.

MAIA, L. C. Micorrizas. In: Esposito, E.; Azevedo, J. L. de (Org.). *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. 2. ed. Caxias do Sul: Educs, 2010. Cap. 16. p.573-612.

MANOHARACHARY, C.; MUKERJI, K.g.. Mycorrhizal Studies. In: Mukerji, K.g.; Manoharachary, C.; Chamola, B.p.. *Techniques in Mycorrhizal Studies*. India: Springer Science+business Media, 2002. p.1-5.

MILLER, Mark A. *et al.* Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Gateway Computing Environments Workshop (Gce), nov. 2010. IEEE. <http://dx.doi.org/10.1109/gce.2010.5676129>.

NATARAJAN, K.; MOHAN, V. Identification of Ectomycorrhizas. In: Mukerji, K.g.; C.Manoharachary; Chamola, B.p.. *Techniques in Mycorrhizal Studies*. India: Springer Science+business Media, 2002. p.172-205.

NEUENKAMP, Lena *et al.* Benefits of mycorrhizal inoculation to ecological restoration depend on plant functional type, restoration context and time. *Fungal Ecology*, v. 40, p. 140-149, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2018.05.004>.

PEC, Gregory J. *et al.* The effects of ectomycorrhizal fungal networks on seedling establishment are contingent on species and severity of overstorey mortality. *Mycorrhiza*, v. 30, n. 2-3, p. 173-183, 22 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-020-00940-4>.

RONQUIST, Fredrik *et al.* MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, v. 61, n. 3, p. 539-542, 22 fev. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.

ROY, Mélanie *et al.* Diversity and Distribution of Ectomycorrhizal Fungi from Amazonian Lowland White-sand Forests in Brazil and French Guiana. *Biotropica*, v. 48, n. 1, p. 90-100, jan. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/btp.12297>.

ROY, Mélanie *et al.* The (re)discovery of ectomycorrhizal symbioses in Neotropical ecosystems sketched in Florianópolis. *New Phytologist*, v. 214, n. 3, p. 920-923, 11 abr. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.14531>.

TEDERSOO, Leho *et al.* High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*, v. 90, n. 1, p. 135-159, maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0>.

VANEGAS-LEÓN, M. L. Ectomicorrizas tropicais: Estudos de caso na Mata Atlântica. 2017. 78 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

VASCO-PALACIOS, Aída M. *et al.* Ectomycorrhizal fungi diversity in a white sand forest in western Amazonia. *Fungal Ecology*, v. 31, p. 9-18, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2017.10.003>.

VERBEKEN, A. *et al.* Tales of the unexpected: angiocarpous representatives of the Russulaceae in tropical south east asia. *Persoonia - Molecular Phylogeny And Evolution Of Fungi*, v. 32, n. 1, p. 13-24, 30 jun. 2014. Naturalis Biodiversity Center. <http://dx.doi.org/10.3767/003158514x679119>.

WHITE, T.J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Em: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J. & White, T.J. eds. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, p. 315–322, 1990.

WURZBURGER, Nina *et al.* From mycorrhizal fungal traits to ecosystem properties - and back again. *Journal of Ecology*, v. 106, n. 2, p. 463-467, 13 fev. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2745.12922>.

APÊNDICE A – Protocolo de extração de DNA (Basidiomas)

1. Macere com ajuda de um pilão e um cadinho os basidiomas com nitrogênio líquido e após macerado transfira o material para um microtubo de 1,5 ml ou 2 ml;
2. Deixe o CTAB em banho maria à 60 °C antes de usá-lo;
3. Adicione 800 µL da solução de CTAB e adicione 4 µL de β-mercapto;
4. Incube a amostra a aproximadamente 60 °C por 1 hora em banho maria;
5. Adicione 800 µL da solução 24:1 Clorofórmio: Álcool isoamílico e misture bem;
6. Centrifugue por 10 min em 13000 rpm. Após a centrifugação, a amostra estará dividida em 3 fases: uma superior aquosa (contendo o DNA), uma fase intermediária sólida (detritos) e uma fase inferior composta de clorofórmio;
7. Cuidadosamente, pipete a fase superior retirando-a e colocando em um novo microtubo, cuidado para não pipetar nenhuma parte das fases intermediária e inferior;
8. Adicione nesse novo microtubo 400 µL de Isopropanol gelado e misture bem;
9. Armazene a amostra em congelador por até 24 horas a overnight;
10. Centrifugue a amostra por 3 minutos a 13000 rpm;
11. Pipete e descarte todo o líquido, com cuidado para não perder o pellet de DNA;
12. Adicione 700 µL de Etanol 70% gelado e misture bem;
13. Centrifugue por 1 minuto a 13000 rpm e após isso pipete e descarte o líquido, com cuidado para não perder o pellet;
14. Adicione 700 µL de Etanol 95% gelado e misture bem;
15. Centrifugue por 1 minuto a 13000 rpm e após isso pipete e descarte o líquido, com cuidado para não perder o pellet;
16. Seque o pellet de DNA, deixando o tubo aberto até que todo álcool evapore;
17. Ressuspenda as amostras em 100 µL de tampão TE e armazene pelo menos 1 hora em freezer antes de realizar um novo procedimento.

APÊNDICE B – Protocolo de extração de DNA (Raiz)

1. Macere com nitrogênio líquido o tecido vegetal (raiz sem manto) e após macerado transfira o material para um microtubo de 1,5 ml ou 2 ml;
2. Adicione 800 μ L de solução CTAB
3. Incube à 65 °C por 1h em banho maria, agitando a cada 10 minutos;
4. Deixar esfriar em temperatura ambiente por 5 minutos;
5. Adicione 800 μ L da solução 24:1 Clorofórmio: Álcool isoamílico gelado e misturar delicadamente por inversão por aproximadamente 1 minuto;
6. Centrifugue a 10000 rpm por 10 minutos e transfira a fase aquosa superior para um microtubo limpo de 1,5 ml ou 2 ml;
7. Adicione novamente 800 μ L da solução 24:1 Clorofórmio: Álcool isoamílico gelado e misturar delicadamente por inversão por aproximadamente 1 minuto;
8. Centrifugue a 10000 rpm por 10 minutos e transfira a fase aquosa superior para um microtubo limpo de 1,5 ml ou 2 ml;
9. Adicione 300 μ L de isopropanol e misture delicadamente por inversão por 1 minuto;
10. Armazene a – 20 °C por até 24 horas em overnight;
11. Centrifugue a 10000 rpm por 10 minutos e descarte o sobrenadante;
12. Adicione 500 μ L de etanol 70% gelado e centrifugue a 10000 rpm por 5 minutos;
13. Descarte o sobrenadante com o auxílio da micropipeta;
14. Repita a etapa 12 e 13 utilizando etanol 80% e depois etanol 90%;
15. Seque o pellet de DNA, deixando o tubo aberto até que todo álcool evapore;
16. Ressuspenda as amostras em 50 μ L de tampão TE;
17. Adicione 1 μ L de RNase (10 mg/ml) e deixe o tubo em temperatura ambiente por 2 – 24 horas (etapa facultativa);
18. Armazene pelo menos 1 hora em freezer antes de realizar um novo procedimento.

APÊNDICE C – Protocolo de PCR direta (ECMs)

| | |
|------------------------|-------|
| MasterMix 5x ----- | 10 µL |
| Primer F ----- | 2 µL |
| Primer R ----- | 2 µL |
| H ₂ O ----- | 30 µL |
| BSA ----- | 2 µL |
| DNA ----- | 4 µL |
| Total ----- | 50 µL |

Os primers são utilizados na concentração de 10 pMol/L.

O programa usado no termociclador teve a desnaturação inicial (6min 95°C), 30 ciclos (30s 94 °C; 30s 55 °C; 1 min 72 °C) e uma extensão final (10 min 72°C).

APÊNDICE D – Protocolo de PCR ITS (Basidioma)

| | |
|------------------------|-------|
| MasterMix 5x ----- | 5 µL |
| Primer F ----- | 1 µL |
| Primer R ----- | 1 µL |
| H ₂ O ----- | 15 µL |
| DNA ----- | 3 µL |
| Total ----- | 25 µL |

Os primers são utilizados na concentração de 10 pMol/L.

O programa utilizado no termociclador teve a desnaturação inicial (2min 94°C), 40 ciclos (30s 94 °C; 45s 55 °C; 1 min 72 °C) e uma extensão final (7 min 72°C).

APÊNDICE E – Protocolo de PCR ITS (Raiz)

| | |
|------------------------|-------|
| MasterMix 5x ----- | 5 µL |
| Primer F ----- | 1 µL |
| Primer R ----- | 1 µL |
| H ₂ O ----- | 15 µL |
| DNA ----- | 3 µL |
| Total ----- | 25 µL |

Os primers são utilizados na concentração de 10 pMol/L.

O programa usado no termociclador teve a desnaturação inicial (2min 94°C), 30 ciclos (1min 94 °C; 1min 50 °C; 1,5min 72 °C) e uma extensão final (4 min 72°C).

APÊNDICE F – Protocolo de Purificação

1. Adicionar o mesmo volume de PEG 20% para o volume de DNA (produto de PCR) (25 μ L para extração de DNA e 50 μ L para PCR direta);
2. Incubar 30 minutos em banho maria a 37 °C;
3. Centrifugar 15 minutos a 13000 rpm;
4. Descartar o sobrenadante com a micropipeta, deixando sempre o fundo onde está o pellet;
5. Adicionar 125 μ L de etanol 80% gelado (250 μ L para PCR direta);
6. Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm;
7. Repetir a etapa 4;
8. Adicionar 125 μ L de etanol 95% gelado (250 μ L para PCR direta);
9. Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm;
10. Retirar o excesso de líquido e secar em temperatura ambiente até evaporar todo o etanol (deixar overnight ou utilizar banho seco em aproximadamente 37 °C);
11. Ressuspender em 25 μ L de água Miliq (ultrapura) ou tampão TE (50 μ L para PCR direta);