

Kelly Besen

**AUTOECOLOGIA DE *Gaylussacia brasiliensis* (ERICACEAE),
EM RESTINGA DA ILHA DE SANTA CATARINA,
SUL DO BRASIL**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais Departamento de Fitotecnia, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Paulo E. Lovato

Florianópolis
2017

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

Besen, Kelly
Autoecologia de *Gaylussacia brasiliensis*
(Ericaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina,
sul do Brasil / Kelly Besen ; orientador, Paulo
Emílio Lovato, 2017.
205 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Valor
adaptativo. 3. Mutualismo. 4. Biologia reprodutiva.
5. Fungos endofíticos ericóides. I. Lovato, Paulo
Emílio. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais. III. Título.

**Autoecologia de *Gaylussacia brasiliensis* (Ericaceae),
em restinga da Ilha de Santa Catarina, Sul do Brasil**

por

Kelly Besen

Tese julgada e aprovada em 18/12/2017, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

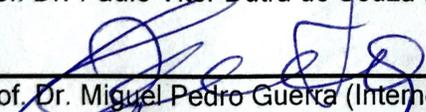
Banca Examinadora:



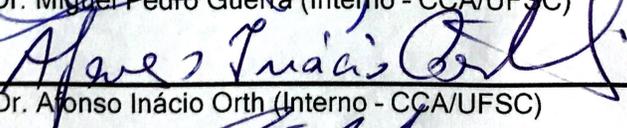
Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Presidente - CCA/UFSC)



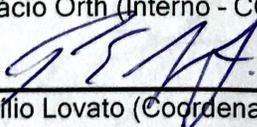
Prof. Dr. Paulo Vitor Dutra de Souza (Externo - UFRGS)



Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Interno - CCA/UFSC)



Prof. Dr. Aronso Inácio Orth (Interno - CCA/UFSC)



Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, dezembro de 2017

*Este trabalho é dedicado ao meu filho
Muni, companheiro de todas as horas.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família que sempre me deu apoio, principalmente aos meus pais Saulo e Laurita que me deram suporte e me suportaram.

Ao meu maravilhoso filho Muni, que nunca desistiu de mim, sempre ao meu lado, me ensinando o amor verdadeiro.

Ao meu Orientador Paulo Lovato que acreditou em mim. Assim como os professores do RGV, Nodari, Guerra, Orth, Maurício, Robson e todos os outros.

As minhas amigas, mulheres maravilhosas, que compartilharam seus caminhos alegrando esta trajetória, Fabiane, Marcia Regina, Maiby e especial agradecimento a minha querida amiga Vanessa Tedesco, sem ela eu não teria conseguido. As colegas, Marcia Patricia, Tassiane, Rosenilda, e todas as mulheres cientistas guerreiras que ajudam umas às outras.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia do Solo, Marcos, Marcelo e Alceu, pela convivência e ajuda. Ao Edenilson e Douglas Cardoso pela disponibilidade em ajudar com a extração de DNA e as sequências.

A equipe do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC), principalmente a super profissional e amiga Eliana Medeiros, que me abriu as portas viabilizando meu estudo.

A equipe do Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG/UFSC), que gentilmente cederam espaço e conhecimento, especialmente a professora Marisa Santos, pela sua atenção e ajuda na caracterização da minha estrutura subterrânea.

A equipe da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI/Unicamp), por compartilhar conhecimentos, em especial a querida Dra. Derlene Attili de Angelis, pela sua atenção aos meus fungos.

Todas as pessoas que me acompanharam nas interessantes jornadas as dunas da Lagoa da Conceição. E as pessoas que passaram pela minha vida nestes anos de trabalho intenso.

A todos os nãoos que me mostraram como sou capaz de transpor os desafios. Estes me fizeram forte e imbatível. A todos os sins que me revigoraram nas horas mais difíceis. Estes me tornaram criativa e confiante.

COURAGE

*“Courage is the price that life exacts for granting peace.
The soul that knows it not, knows no release from little things;
Knows not the livid loneliness of fear, nor mountains heights
where bitter joy can hear the sound of wings.
How can life grant us boon of living, compensate for dull-grey
ugliness and pregnant hate, unless we dare the soul's dominion?
Each time we make a choice, we pay with courage to behold the
restless day, and count it fair.”*
(Amelia Earhart, 1927)

RESUMO

A camarinha, *Gaylussacia brasiliensis* Meisn. (Ericaceae), é um recurso genético de valor potencial e um importante alvo de estudo. Essa planta arbustiva produz frutos comestíveis, semelhantes aos mirtilos, com princípios ativos funcionais e medicinais. Ela pode ainda ter importante função na restauração ambiental de áreas degradadas. Essa espécie possui características que a tornam um modelo para estudos ecológicos, podendo fornecer informações sobre como as relações mutualísticas influenciam no valor adaptativo. A espécie está presente em ambientes que possuem em comum condições severas e possui plasticidade ecológica para colonizar diversos biomas brasileiros, da costa litorânea a campos de altitude, o que indica sucesso reprodutivo e adaptativo. A associação com fungos potencializa a absorção de nutrientes minerais pelo simbionte hospedeiro, a termotolerância, a resistência a agentes patogênicos e herbivoria, além de proteção contra condições tóxicas do ambiente. No entanto, para a pesquisa desses complexos sistemas de interações, é necessário que sejam contempladas diversas variáveis que direcionam essa sutil e dinâmica relação. Por este motivo, a presente pesquisa se propôs a adotar uma abordagem naturalista, realizando observações do sistema natural, em escala de paisagem, com o mínimo de intervenção possível. Dois aspectos principais foram abordados: a biologia reprodutiva, para buscar informações de como *G. brasiliensis* direcionou sua estratégia evolutiva de dispersão e perenização; e a associação com fungos endofíticos, pois essa interação parece ser a chave da capacidade adaptativa em ericáceas. Para isto foi realizada pesquisa a campo, por meio de observações e coleta e análise de material biológico. Os resultados indicam que a camarinha possui complexa relação com polinizadores; a plasticidade da espécie em sua morfologia floral para a adaptação à disponibilidade de polinizadores é possivelmente um fenômeno epigenético. As sementes são ortodoxas, e a planta possui uma estrutura subterrânea especializada para reserva e reprodução vegetativa, o *lignotuber*, que ainda não havia sido descrito para este gênero. Em conclusão, o sucesso reprodutivo da camarinha é devido a um conjunto de estratégias evolutivas. A importância do mutualismo foi verificada no sistema radicular de *G. brasiliensis*, onde foi documentada intensa colonização por fungos endofíticos, apresentando diferentes estruturas de associação. Esta relação simbiótica é dinâmica, e parece estar relacionada com a mudança da composição da comunidade vegetal, pela introdução de planta exótica ou pela ação da queimada, além de fatores climáticos. As raízes capilares de *G. brasiliensis* apresentam ampla diversidade de

fungos, que podem ser isolados e cultivados in vitro. O estudo morfológico e filogenético de alguns destes fungos, assim como da interação fungo-planta, forneceu informações sobre a relevância funcional de traços morfológicos e similaridade genética dos fungos. Os resultados deste trabalho de pesquisa revelam complexa relação de *G. brasiliensis* com os organismos polinizadores e com a microbiota. Esses fatos direcionam para a hipótese de que, para a conservação desta espécie, é fundamental a conservação do ecossistema no qual ela se insere. A hiperdiversidade de fungos associados a raízes desta Ericaceae, realizando funções ecológicas diversificadas em frente a situações extremas, torna esse sistema potencialmente mutualístico um interessante alvo de estudos e conservação. Esses organismos são potenciais ferramentas biotecnológicas, para produção de alimentos, biorremediação entre outras funções.

Palavras-chave: Biologia reprodutiva. Ericaceae neotropical. Estratégia evolutiva. Fungos endofíticos ericóides. Mutualismo. Valor adaptativo.

ABSTRACT

Gaylussacia brasiliensis Meisn. (Ericaceae), is a genetic resource of potential value and a major study subject. This shrub produces edible fruits, similar to blueberries, with functional and medicinal active principles. It may also play a relevant role in the restoration of degraded areas. This species has characteristics that make it a model for ecological studies and can provide information on how mutualistic relations influence fitness. It is present in environments that have harsh conditions, and its ecological plasticity makes it able to colonize several Brazilian biomes, from coastal areas to altitude fields, which indicates reproductive and adaptive success. The association with fungi improve uptake of mineral nutrients by the host-symbiont, thermotolerance, resistance to pathogens and herbivory, as well as protection against toxic conditions. However, research is needed on these complex systems of interactions, so that several variables that direct this subtle and dynamic relationship are considered. The present research adopted a naturalistic approach, making observations of the natural system, at a landscape scale, with the least possible intervention. Two main aspects were addressed: reproductive biology, to search information on how *G. brasiliensis* has directed its evolutionary strategy of dispersion and perennialism; and the association with endophytic fungi, since such interaction seems to be key to adaptive capacity in Ericaceae. Field research was carried out through observations, collection, and analysis of biological material. The results indicate that the *G. brasiliensis* has a complex relationship with pollinators. The species plasticity in floral morphology for adaptation to pollinator availability is possibly an epigenetic phenomenon. The seeds are orthodox, and the plant has specialized subterranean structures for reserve and vegetative reproduction, the lignotubers, which had not yet been described for this genus. In conclusion, reproductive success of this plant species is due to a set of evolutionary strategies. The root system of *G. brasiliensis* has intense colonization by endophytic fungi, presenting different association structures. This symbiotic relationship is dynamic and seems to be related to changes in plant community composition, the introduction of exotic plants or fir, as well as climate factors. Hair roots of *G. brasiliensis* harbor a wide diversity of fungi, which can be isolated and cultured in vitro. Morphological and phylogenetic analyses of some of the fungi, as well as fungus-plant interactions, provided information on the functional relevance of morphological traits and genetic similarity of fungi. The results reveal a complex mutual relationship of *G. brasiliensis* with pollinating organisms and mycobiota. Those observations lead to the

hypothesis that conservation of this species requires ecosystem conservation. The hiperdiversity of fungi associated with roots of this Ericaceae, which have diverse ecological functions in extreme situations, makes this potentially mutualistic system an interesting target for research and conservation. Those organisms are potential biotechnological tools, for food production and bioremediation, among other functions

Keywords: Reproductive biology. Neotropical Ericaceae. Evolutionary strategy. Ericoid endophytic fungi. Mutualism. Fitness.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Parque municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, Florianópolis. (A) Vegetação de Restinga em dunas fixas, com *Gaylussacia brasiliensis* (setas). (B a E) Aspectos de *G. brasiliensis*; (B) planta em solo arenoso; (C) flores e frutos imaturos; (D) cachos com frutos imaturos, (E) e frutos maduros.34

Figura 2 - Fluxograma mostrando aspectos abordados na pesquisa sobre autoecologia de *Gaylussacia brasiliensis*. Indicando as estratégias evolutivas da espécie e suas possíveis consequências para a capacidade adaptativa.37

Figura 3 - (A) Brasil, mostrando o Estado de Santa Catarina; (B) Ilha de Santa Catarina, onde está o (C) Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição.41

Figura 4 - *Gaylussacia brasiliensis* Meisn. (1) aspecto geral da enervação da lâmina foliar; (2) flor; (3) estame; (4) cálice ovário estilete; (5) fruto; (6) semente; (7) hábito.46

CAPÍTULO 1

Figura 5 - Análise de viabilidade e longevidade de sementes de *Gaylussacia brasiliensis*. Percentagem de sementes cheias (com embrião e endosperma); de sementes vazias (sem embrião e endosperma); e viabilidade total (sementes cheias com potencial de germinação, analisado com o teste tetrazólio). Sementes coletadas nos anos 2005, 2006, 2007, 2009, 2014, 2015 e 2016, e armazenadas a 4 °C por períodos 11, 10, 9, 8, 2 anos e menos de 1 ano.74

Figura 6 - Sementes de *Gaylussacia brasiliensis*, cortadas longitudinalmente expondo o endosperma e embrião, submetidas a teste de tetrazólio. (A-D e G) Sementes viáveis, mostrando tons avermelhados da redução oxidativa do tetrazólio que ocorre em tecidos vivos (setas pretas). (E) Semente viável e (F, H, I) sementes não viáveis nas quais existe indicação de tecido danificado, pela não coloração (seta branca), ou coloração parcial com o sal tetrazólio.75

Figura 7 - Caracterização de néctar de *Gaylussacia brasiliensis* em Florianópolis. (A) Volume (μL / flor) de néctar potencial e concentração de açúcar (%) por flor (em 24 horas); e néctar instantâneo às 8:00 e 17:00h em dezembro de 2014; (B) volume de néctar e instantâneo (μL / flor), e

- concentração de açúcar no néctar instantâneo (%) em coleta horária 6:00, 7:00, 8:00 e 9:00h em janeiro de 2016.77
- Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando (A) disco nectarífero no topo do ovário; (B) detalhe de poro nectarífero, estômatos modificados.77
- Figura 9 - Morfologia floral de *Gaylussacia brasiliensis*. (A) Flor exibindo abertura da corola e hercogamia, estigma com pólen aderido; (B) flor após a visita por beija-flor, abertura da corola com danos. (C) ovários decalocular; (D) corola danificada por *Trigona spineps*; (E, F) inflorescências danificadas por pilhadores.78
- Figura 10 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal a laser (MCL) mostrando detalhes das estruturas masculina e feminina das flores de *Gaylussacia brasiliensis*: (A) antera poricida com poro amplo; (B) detalhe de grãos de pólen sendo liberados pelo poro; (C) caracterização de tétrade com aproximadamente 40 µm de diâmetro; (D) pólen em MCL, corado com fucsina ácida; (E) MEV do estigma; (F) MCL do estigma.78
- Figura 11 - Germinação *in vitro* de pólen de *Gaylussacia brasiliensis* seis horas após a semeadura. (A) meio 0 % de sacarose e 0 mg de ácido bórico; (B) 10 % de sacarose e 40 mg de ácido bórico; (C) 20 % de sacarose e 40 mg de ácido bórico.79
- Figura 12 - Comportamento variado de *Xylocopa brasilianorum* (A, C) e *Bombus morio* (B, D) visitando *Gaylussacia brasiliensis*. (A) *X. brasilianorum* produzindo sonicação; (B) *B. morio* coletando néctar pela abertura da corola; (C) *X. brasilianorum* perfurando a base da corola para roubar néctar; (D) *B. morio* com pólen espalhado por todo o corpo, com aglomerados no abdômen e aparelho bucal (setas laranjas)80
- Figura 13 - Visitantes florais de *Gaylussacia brasiliensis* que não produzem sonicação. (A) Espécie de Lepidoptera, coletando néctar pela abertura da corola; (B) *Apis mellifera*, coletando pela abertura da corola; (C) *Trigona spinipes*, pilhando; (D) Formigas (*Odontomachus* spp.) pilhando recursos florais.81
- Figura 14 - Espécie de Lepidoptera, Sphingidae, mariposa *Aellopos ceculus*, espécimes coletados na Restinga em 11/02/2015, visitando flores de *Gaylussacia brasiliensis*. (A, B) pólen concentrado na probóscide; (C, D) indivíduos com possível dimorfismo sexual macho e fêmea respectivamente; (E, F) microscopia de varredura, mostrando a ausência de pólen em outras partes do corpo.82

Figura 15 - Imagens de microscopia de varredura em insetos capturados visitando flores de *Gaylussacia brasiliensis*, mostrando pólen da camarinha (setas brancas), *Xylocopa brasilianorum* (A-D) e de *Bombus morio* (E-H). (A) Cabeça de *X. brasilianorum* com aglomerados de pólen; (B) detalhe da mandíbula contendo pólen de camarinha e outras espécies de plantas; (C) pólen de camarinha e outras espécies no abdômen ventral; (D) pata posterior com pólen de diversas espécies de plantas; (E) Cabeça de *B. morio* apresentando alta concentração de pólen de diversas espécies; (F) curvícula com pólen de diversas espécies; (G) pata com pouco pólen; (H) tórax com pólen de diversas espécies.83

Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando *Apis mellifera* capturada visitando *Gaylussacia brasiliensis*, com pólen desta planta aderido ao corpo (setas brancas). (A) Glossa de com pólen; (B) abdômen com pólen.84

Figura 17 - Sistema subterrâneo de *Gaylussacia brasiliensis*. (A) *lignotuber* contendo gemas acessórias epicórmicas (setas brancas), emitindo raízes estruturais e capilares; (B) secção transversal do *lignotuber* em microscopia óptica; (C, D) *lignotuber* em microscopia de varredura; (C) vista geral e (D) detalhe do parênquima medular contendo grãos de amido (seta). Parênquima medular = pm; súber = su; sistema vascular = sv.85

CAPÍTULO 2

Figura 18 - Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, Florianópolis, Santa Catarina. Sinalizadas as áreas de coletas de raízes para avaliação das estruturas de associação fungo-planta.96

Figura 19 - Áreas de estudo, de *Gaylussacia brasiliensis*, fotos de janeiro de 2015. (A) A1N com pouca ação antrópica, plantas de *G. brasiliensis* adensadas dunas fixas, terreno suave ondulado a ondulado; (B) A1Q mesmas características da área anterior, A1, após evento de queimada; (C) A3N área com baixa ação antrópica, plantas distribuídas aleatoriamente, terreno plano a baixada; (D) A3P mesmas características da área anterior, A3 com presença da planta invasora *Pinus* spp.97

Figura 20 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis*, com crescimento secundário (Rs), raízes capilares (Rc).98

Figura 21 - Imagens de microscopia óptica de secções transversais de raízes *Gaylussacia brasiliensis*. (A) raiz capilar *in natura* com células epidérmicas alargadas e parede externa espessada (e), duas camadas de córtex (c), endoderme (en), xilema primário (x), floema primário (f); (B)

raiz com crescimento secundário mostrando súber (S), periciclo (pe), floema primário (f), floema secundário (fs), câmbio vascular (cv), xilema secundário (xs), xilema primário100

Figura 22 - Distribuição dos dados de colonização por fungos endofíticos em raízes de *Gaylussacia brasiliensis* nas quatro áreas de estudo, em área natural, em dois anos. A1N e A3N = baixa ação antrópica; A1Q = regeneração após queimada; A3P = coexistindo com *Pinus* sp., nos anos de 2015 □ e 2016 ▣101

Figura 23 - Raízes capilares de *Gaylussacia brasiliensis* em microscopia óptica, (A) *in natura* com intensa colonização por fungos septados escuros (DSE); (B) detalhe de célula colonizada por DSE; (C) com rede frouxa de hifas hialinas extra radiculares (azul de anilina); (D) detalhe de célula colonizada por fungo endofítico com parede espessada (seta preta); (E) micorriza ericóides colonizando células através da parede celular (azul de anilina); (F) raiz capilar clareada com água alcalina, com hifas extra radiculares.102

Figura 24 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis* (A-C) coexistindo com *Pinus* sp.; (A) estrutura colonizada por fungos com escleródios (seta preta); (B, C) microscopia óptica (MO) mostrando colonização de raízes curtas com estrutura modificada; (D) MO de raiz oriunda de área de queimada com estrutura de colonização e com estruturas eletrodensas (setas pretas) (corada com azul de anilina); (E, F) raízes *in natura*, de área com baixa ação antrópica, mostrando hifas melanizadas penetrando a epiderme.103

Figura 25 - Imagens de microscopia confocal a laser (MCL) de raízes de *Gaylussacia brasiliensis*, tecido fúngico fluorescendo em vermelho (fucsina ácida). (A-C) Raízes capilares de área com pouca ação antrópica; (A) padrão de micorriza ericóides com hifas grossas; (B) micorriza ericóides com hifas delgadas, (C) com colonização intensa em ramificação lateral. (D) Raiz de área em dois meses regeneração após queimada, estruturas intracelulares semelhantes a microescleródios (seta branca); (E-F) raízes coexistindo com *Pinus* sp., (E) mostrando células colonizadas (seta branca); (F) com crescimento secundário, colonização intercelular (seta branca).104

Figura 26 - Imagens de microscopia confocal a laser de raízes de *Gaylussacia brasiliensis* coradas com fucsina ácida, de áreas Restinga com pouca ação antrópica, fungos fluorescendo em vermelho. (A) Micorriza ericóide, possivelmente em diferentes estádios de desenvolvimento, fase inicial de colonização hifas próximas a parede

(seta branca), em fase de degeneração (seta vermelha), núcleo da célula vegetal (*?), pontos de infecção (setas azuis). (B-C) Raiz com crescimento secundário colonizada por fungos, (B) hifas extra radiculares, e colonização intracelular (seta branca); (C) secção transversal.105

Figura 27 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis* em áreas com pouca ação antrópica em Microscopia Eletrônica de Varredura. (A) Rede extra radicular de hifas; (B) Fungo penetrando a epiderme da raiz por espaço intercelular, (C) detalhe da estrutura similar a apressório.106

Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura em raízes de *Gaylussacia brasiliensis*. (A, B) raízes estruturais de área com baixa ação antrópica com presença de hifas e estruturas extra radiculares (setas brancas). (C-E) Raízes de área com dois meses regeneração após queimada; (C) raiz com hifas extra radiculares; (D) micélio extra radicular com estrutura irregular; (E) raiz com morfologia modificada pela presença de fungos (seta branca), raiz com poucas hifas extra radiculares (seta preta); (F) raiz de planta coexistindo com *Pinus* sp., hifa penetrando a epiderme (seta branca).107

CAPÍTULO 3

Figura 29 - Número de fungos isolados de raízes de *Gaylussacia brasiliensis*, no Parque Municipal da Lagoa da Conceição, Florianópolis. Quatro áreas de coleta de raízes em 2 anos. A1N com adensamento de plantas e baixa ação antrópica; A1Q regeneração após queimada; A3N com distribuição aleatória de plantas e pouca ação antrópica; A3P com presença da invasora *Pinus* spp.124

Figura 30 - Análise dos Componentes Principais (ACP), correlacionando fungos isolados e características morfológicas, representando as observações (140 colônias) e as variáveis (10 características macro morfológicas). No eixo F1 as observações/ colônias estão distribuídas em agrupamentos correlacionados com a cor, taxa de crescimento e textura, sendo que as colônias com coloração escura (melanina) e de crescimento lento estão na parte negativa do eixo, explicando 24,87 % da distribuição. No eixo F2 está correlacionado com a presença de pigmentação no meio de cultura (metabólito secundário), localiza as colônias na parte negativa do eixo; forma, textura e topografia parecem ser os componentes agrupadores na parte positiva do eixo que explica 16,79 da distribuição. O confrontamento com a modelagem por observação está indicando morfotipos circulado em azul, circulado em vermelho estão os representantes dos morfotipos.127

- Figura 31 - Dendrograma da Análise de Cluster Aglomerativa Hierárquica (CAH) de 140 colônias de fungos isolados de raízes de *Gaylussacia brasiliensis*, gerado a partir de uma matriz composta por variáveis macro morfológicas e culturais agrupadas por similaridade utilizando coeficiente de correlação de Pearson e método de ligação simples. No índice de similaridade 0,89 são observados 20 agrupamentos. As setas indicam as colônias representantes dos morfotipos selecionados para análise. Losango vermelho indica os nós e as linhas tracejadas o nível de similaridade quando confrontados com a modelagem por observação. (Próxima página)128
- Figura 32 - Classificação dos fungos endofíticos das raízes de *Gaylussacia brasiliensis* avaliados. Pertencentes ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina. Foi representado por três classes, seis ordens, sete famílias e oito gêneros.130
- Figura 33 - Morfoespécie Gb47, *Paraconiothyrium* sp. em meio Ágar Malte Levedura (AML, 25 °C no escuro). (A) cultivos com 60 dias, placa da esquerda isolado do campo, placa da direita reisolado do experimento; (B) verso de cultivo com 28 dias; (C) conidiomata tipo picnídio complexo (com azul de anilina); (D) cavidade do picnídio com numerosos conídios; (E) parede conidiomatal com textura angular (seta) e conídios, (F) detalhe de células conidiogênicas e conídios..132
- Figura 34 - Morfoespécie Gb209', *Curvularia* sp. em meio ágar malte levedura (AML, 25 °C no escuro). (A) colônia com 15 dias; (B) conidióforos com conídios (setas pretas); (C) Células conidiogênicas com início de formação de conídio (seta preta). Conexão de grampo de outro fungo presente na cultura (seta branca); (D) conídio pigmentado, 4-septado, elipsóide, fusiforme, curvo..133
- Figura 35 - Morfoespécie Gb09, *Penicillium* sp. (?), (A) cultivado em Ágar Malte Levedura (AML) com 15 dias. Imagens em microscopia óptica MO (B, C, D); (B) sistema de hifas; (C) acomata tipo cleistotécio mostrando diferentes fases de maturação em 10 dias de incubação; (D) cleistotécio contendo ascos com 60 dias; (E, F) imagens em microscopia eletrônica de varredura, com 38 dias, ascósporos sendo liberado pelo cleistotécio através de “poros” um a um (setas brancas). (G) Colônia com 40 dias cultivada em Melin-Norkrans Modificado (MNM). (H) Em MO agrupamento de hifas diferenciadas tipo escleródio; (I, J) detalhe mostrando células dilatadas, talvez para formar conídios (Figs. 45F-45I).
.....135

Figura 36 - Morfoespécie Gb225, *Cladophialophora* sp., cultivada em meio Ágar Martin Rosa de Bengala (ARM, 25 °C no escuro); (A) 40 dias em placa de 60 mm, (B) hifas generativas; (C) cadeia de células conidiais; (D-F) microscopia eletrônica de varredura; (D) sistema de hifas agrupadas para formar conídios; (E) aglomerados de células conidiais leveduriformes; (F) detalhe de vesícula terminal dilatada que origina os conídios leveduriformes, três aumentaram para formar conídios, pluge septal na junção entre um conídio e uma célula subtendente (seta); (G) conídios maduros que se separam da região terminal de um ramo e diminuem abruptamente na extremidade proximal (seta)136

Figura 37 - Morfoespécie Gb231, *Diaporthe* sp. cultivado em Ágar Malte Levedura (AML, 25 °C no escuro); (A) 15 dias incubação; (B, C) com 21 dias, ante verso e verso respectivamente; (D-G) possível alongamento do peritécio, (D, F) com 15 dias em microscopia eletrônica de varredura (MEV); (E, G) com 30 dias em microscopia óptica (MO). (H) Massa estromática, possivelmente formando conidioma ou ascoma; (I) hifas, e clamidósforo (?) em MO corado com azul de anilina; (J) hifas com 7 dias mostrando anastomose em MEV.138

Figura 39 - Morfoespécie Gb207, *Arcopilus* sp. (A) colônia cultivada em meio Ágar Malte Levedura (AML, 25 °C no escuro), com 24 dias; (B) Em Melin-Norkrans Modificado, mostrando exsudato difuso no meio, 7 dias; (C) ascoma tipo peritécio (rompido artificialmente) mostrando ascos (seta) e ascósporos; (D) peritécio subgloboso liberando ascósporos pelo ostíolo (setas) 20 dias; (E-G) com 24 dias, (E) ascomata com setas flexíveis e curvadas; (F) ascomata com textura angularias e (G) no detalhe ascogênese; (H) peritécio com ostíolo liberando ascósporos, com 28 dias, (I) peritécio contento ascósporos maduros, 50 dias; (H) sistema de hifas com 7 dias (corado com azul de anilina).140

Figura 40 - Morfoespécie Gb260, *Chaetomium* sp., cultivado em Ágar Malte Levedura (25 °C no escuro), (A, B) colônia com 28 dias, anteverso e verso respectivamente; (C) cultivado em Melin-Norkrans Modificado, exsudato difuso no meio (seta) 28 dias. (D) Peritécio liberando ascósporos pelo ostíolo, 28 dias; (E) peritécio com esporos e hifas setosas pigmentadas; (F-H) microscopia confocal de varredura, (F) ascoma com setas na parte distal, ascósporos em forma de disco com um sulco central côncavo, (G) detalhe dos ascósporos com hifas ornamentadas; (H) células conidiogênicas.141

Figura 41 - Índice de colonização de raízes de *Gaylussacia brasiliensis* de experimento com inoculação de fungos endofíticos, isolados de raízes de plantas da mesma espécie. Tratamentos: Controle negativo (-), Controle positivo (+), inoculados com os isolados, Gb47, Gb209', Gb09, Gb225, Gb104, Gb231, Gb207, Gb260.143

Figura 42 - Padrões de colonização em raízes de *Gaylussacia brasiliensis* do controle positivo de experimento em casa de vegetação, imagens em microscopia óptica coradas com azul de anilina. (A) Colonização com estrutura típica de micorriza ericóide (ErM); (B) colonização por ErM e intercelularmente por endofítico septado escuro (DSE); (C) padrão diferente de ErM; (D) colonização intracelular por DSE.144

Figura 43 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis* de experimento em casa de vegetação em microscopia confocal a laser, coradas com fucsina ácida. (A, B) Controle positivo, solo de não autoclavado, intensa colonização formando enovelamento típico de micorrizas ericóides. (C, D, E) Controle negativo, solo autoclavado, colonização por fungos endofíticos inter e intracelulares.145

Figura 44 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis* inoculadas com a morfoespécie Gb47 (*Paraconiothyrium* sp.). Imagens em microscopia confocal a laser mostrando, (A) células colonizadas de forma frouxa, (B) no detalhe hifas passando através da parede celular (setas). (C-F) Imagens em microscopia óptica de (C) estruturas fúngicas intracelulares maiores (seta branca) e menores (seta preta), talvez corpos de frutificação em diferentes estádios; (D) que atinge o tamanho correspondente a totalidade da célula da raiz; (E) parede celular espessas; (F) colonização intercelular e microescleródio intracelular (seta).146

Figura 45 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis* inoculadas com a morfoespécie Gb09 (*Penicillium* sp.). Imagens em microscopia confocal a laser, (A) raiz estrutural colonizada formando ramificações de raiz capilar, (B) detalhe de intensa colonização estimulando a ramificação. (C-H) Imagens em microscopia óptica, (C) formação de numerosas estruturas semelhantes a cleistotécios em intracelularmente, (D) possivelmente células radiculares rompidas liberando cleistotécios. (E) Raiz exibindo estruturas de hifas dilatadas, se formado no interior das células e extrapolando para a parte extra radicular, semelhante a (F) estrutura formada *in vitro* (Fig. 35I e 35J). (F-I) Cultivo *in vitro* com estrutura semelhante a observada na raiz; (G, H) liberando conídios; (I) conidiogênese holoblástica.147

Figura 46 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis* inoculadas com a morfoespécie Gb231 (*Diaporthe* sp.). Microscopia confocal a laser mostrando (A) colonização intensa de raízes capilares, (B) detalhe de estrutura semelhante à observadas *in vitro* (Fig. 37) que pode ser um alongamento de peritécio e estrutura globosa no interior da célula vegetal (seta) (peritécio inicial?). (C) Raiz apresentando o suposto “pescoço” do peritécio saindo da célula (seta amarela) e cicatrizes nas células adjacentes (setas brancas). (D) Estrutura extrapolando a raiz com tamanho que variou entre 20 e 50 µm. (E) Raiz estrutural colonizada. (F) Esquema de seção vertical de estruturas reprodutivas de *Diaphorte parasitica* “Fig. 14” de uma pústula picnidial, cavidade lobulada com conidióforos, produz conídios que transpassam o tecido do hospedeiro; “Fig. 15” pústula peritecial, com vários peritécios mostrando o comprimento total dos pescoços Fonte: HEALD (1913).148

Figura 47 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis*, oriundas de experimento de inoculação com fungos endofíticos. Imagens de microscopia confocal a laser do (A-E) tratamento Gb207 (*Arcopilus* sp.). (A) Raízes intensamente colonizadas, (B) com estruturas fúngicas globosas que podem ser esporos, as paredes da raiz parecem estar em degeneração; (C) células totalmente preenchidas por fungos. (D, E) Tratamento Gb260 (*Chatetomium* sp.), estrutura extra radicular parecida com conidióforo.149

Figura 48 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis* inoculadas com fungos endofíticos em microscopia confocal a laser. (A) Tratamento Gb104 (*Fusarium* sp.) colonização intra e intercelular; (B) Tratamento Gb225 (*Cladophialophora* sp.) pouco investimento em hifas e estruturas tipo escleródios (seta). (C-E) Tratamento Gb209 (*Curvularia* sp. + Basidiomycota), (C) raiz estrutural e capilar colonizadas, (D) no detalhe estrutura fúngica diferenciada. (E) Gb209 liberação de estruturas fúngicas. (F) Tratamento Gb72 (Ascomycota sp.) parede celular espessada, colonização intracelular com estrutura diferenciada.150

Figura 49 - Teste de transmissão horizontal por isolamento de fungos do *lignotuber* de *Gaylussacia brasiliensis*. (A) Fragmento de *lignotuber* utilizado para isolamento de endofíticos (seta verde); (B) colônias de fungos endofíticos isoladas de *lignotuber*, placa da esquerda morfotipo MT2 (Gb261L) identificado como *Arcopilus* sp., placa da direita fungo sp1 e Fungo sp2.151

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Morfologia floral de *Gaylussacia brasiliensis*, comprimento e abertura da corola, do pistilo, do estame, número de anteras, de óvulos e pólen por flor.76

Tabela 2 - Comportamento e frequência de visitantes florais *Gaylussacia brasiliensis* em Restinga de Florianópolis, SC, por período de 28 horas de observação. Pilhagem = Pi; Polinização = Po.80

Tabela 3 - Espécies de insetos potenciais polinizadores coletados em *Gaylussacia brasiliensis*, comprimento das partes do inseto, tórax, abdômen, comprimento do aparelho bucal medido a partir do labro, comprimento total, envergadura da asa (Enver.), localização de pólen e relação possível.....81

Tabela 4 - Características florais de *Gaylussacia brasiliensis*, comparada em diferentes tipos de vegetação: Restinga (Santa Catarina - SC), Mata de Galeria (Minas Gerais - MG) e Campo Rupestre (MG). Comprimento e abertura da corola (ou maior diâmetro), volume de néctar e concentração de açúcar, visitantes mais frequentemente observados e respectivo comprimento do aparelho bucal.84

CAPÍTULO 2

Tabela 5 - Caracterização das áreas de estudo. Áreas A1 e A3, “N” - com baixa ação antrópica, áreas do parque com trilhas utilizadas para recreação, “Q” área em regeneração após queimada e “P” com presença de *Pinus* spp.97

Tabela 6 - Índice de colonização por fungos endofíticos em raízes de *Gaylussacia brasiliensis*, de área de Restinga, em diferentes áreas: A1N e A3N = baixa ação antrópica; A1Q = regeneração após queimada; A3P = coexistindo com *Pinus* sp. Teste de Kruskal-Wallis $\alpha = 0,5$: K (14,07) = 253,5 $p < 0,0001$. Comparações múltiplas pareadas utilizando teste bilateral Dunn, grupos: A, AB, B, C.101

Tabela 7 - Médias sazonais e desvio padrão de dados do período de junho de 2014 a junho de 2016. Temperaturas (Temp.) médias, máximas, mínimas (°C) e precipitação acumulada (mm).108

Tabela 8 - Atributos do solo coletado subjacente às raízes das plantas amostradas, nas quatro áreas de estudo e 2 anos. A1N e A3N = pouca

ação antrópica; AIQ = área em regeneração após queimada; A3P = com a presença de *Pinus* spp.108

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Grupos morfotípicos, variáveis macro morfológicas: crescimento aos 14 dias em malte (média e desvio padrão). Forma - For (C circular, R rizoide, I irregular); Textura - Tex (al = algodonosa, av = aveludada, me = membranosa, gr = granulosa, pu = pulverulenta); Superfície - Sup (li = lisa, ca = camada, fis= fissurada, ru = rugosa); Borda - Bor (re = regular, fil = filiforme, ra = radiada, lo = lobada, ir = irregular); Topografia - Top (pl = plana, el = elevada, pr = pregueada, ap = apiculada); Aspecto = Asp (op = opaco, br = brilhante, um = úmido); Pigmentação do meio = Pig (A = ausente; P = presente).125

Tabela 2 - Identificação das morfoespécies, organizadas por classe, apresentando a hipótese taxonômica baseada no sequenciamento e avaliação morfológica dos espécimes. Similaridade com referência depositada no GenBank, e SH (*species hypothesis*) do UNITE com as referências do GenBank. Todos foram isolados das raízes, exceto Gb261L isolado do *lignotuber*.129

Tabela 3 - Características reprodutivas de onze fungos endofíticos isolados de raízes de *Gaylussacia brasiliensis*. Identificação da morfoespécie, fase reprodutiva observada (teleomórfica, anamórfica ou holomórfica), estrutura de formação de esporos (meióticos e mitóticos), caracterização dos esporos, investimento em esporos e estratégias de dispersão supostas.130

Tabela 4 - Avaliação do teste de inoculação e reisolamento, indicando os tratamentos avaliados, dias de incubação até a avaliação. Número de plantas e seguimentos de raízes ($\pm 1,0$ cm) avaliadas em cada tratamento, e número de plantas e seguimentos onde houve reisolamento. Não inoculado = NI; reisolamento não confirmado = NC.142

Tabela 13 - Resultado do sequenciamento de alguns fungos reisolados no experimento de avaliação da associação endofítica. “M” indicando o fungo que foi inoculado, e “r” os reisolados.143

Tabela 14 - Índice de colonização por fungos endofíticos em raízes de *Gaylussacia brasiliensis*, média e desvio padrão, em experimento com inoculação de fungos em casa de vegetação. Teste de Kruskal-Wallis $\alpha=0,5$: K (16,92) = 974,25; p <0,0001. Comparações utilizando o Teste Dunn bilateral, formando grupos dos menos para mais colonizados A, B, C, D e E.143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE – Água destilada esterilizada
AIB – Ácido indolbutírico
AMF – Fungo micorrízico arbuscular
AML – Ágar Malte Levedura
ARM – Ágar Rosa de Bengala de Martin
°C – Graus Celsius
cm – Centímetro
diam – Diâmetro
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNAr – DNA ribossômico
CR – Criticamente em Perigo
DSE – Endofíticos septados escuro (Classe 4)¹
EN – Em perigo
EcM – Ectomicorriza
EeM – Ectendomicorriza
ErM – Micorriza ericóide
EF – Fungos Endofíticos (Classe 2)¹
FOD – Floresta Ombrófila Densa
g – Grama
G1 – Criticamente em perigo
G3 – Vulnerável
HA – Benefícios de adaptação ao habitat
HTS – *High-throughput sequencing*
ITS – *Internal Transcribed Spacer*
kgf – Quilograma-força
MCL – Microscopia confocal a laser
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MNM – Melin-Norkrans Modificado
MO – Microscopia óptica
M.O. – Matéria orgânica
µg – Micrograma
µL – Microlitro
µm – Micrometro
ng – Nanograma
nm – Nanometro
NA – Benefícios adaptativos

¹ Classificação de Rodriguez (2009).

NHA – Benefícios não-adaptativos ao habitat

OTU – Unidade operacional taxonômica

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PVLG – Poli Vinil Lacto Glicerol

VU – Vulnerável 2

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	33	
1.1.	ESTRUTURA DA TESE	36	
1.2.	PERGUNTA DE PESQUISA E OBJETIVOS	38	
2.	VEGETAÇÃO DE RESTINGA, BIOMA MATA ATLÂNTICA	39	
2.1.	PARQUE MUNICIPAL DAS DUNAS DA LAGOA DA CONCEIÇÃO	40	
2.	AUTOECOLOGIA DE <i>Gaylussacia brasiliensis</i>	43	
3.1.	BIOLOGIA REPRODUTIVA EM ERICACEAE	47	
3.2.	FUNGOS ASSOCIADOS A ERICACEAE	50	
3.2.1.	Fungos endofíticos e micorrízicos	53	
3.2.2.	Estudos sobre diversidade de fungos endofíticos	58	
CAPÍTULO 1			
BIOLOGIA REPRODUTIVA E VISITANTES FLORAIS DE <i>Gaylussacia brasiliensis</i> EM RESTINGA DA ILHA DE SANTA CATARINA.....			65
RESUMO			65
1.1.	INTRODUÇÃO.....	66	
1.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	69	
1.2.1.	Análise de sementes.....	70	
1.2.2.	Características e recursos florais – néctar e pólen.....	71	
1.2.3.	Visitantes florais	72	
1.2.4.	Análises anatômicas por microscopia	73	
1.2.5.	Análise da estrutura subterrânea.....	73	
1.3.	RESULTADOS.....	74	
1.3.1.	Análise de sementes.....	74	
1.3.2.	Características e recursos florais.....	76	
1.3.3.	Visitantes florais.....	79	

1.3.4. Caracterização da estrutura subterrânea.....	85
1.4. DISCUSSÃO	86

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA DE ASSOCIAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E MICORRÍZICOS EM RAÍZES DE <i>Gaylussacia brasiliensis</i> EM ÁREA DE RESTINGA	93
--	-----------

RESUMO	93
2.1. INTRODUÇÃO	94
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	96
2.2.1. Local de estudo e coleta de campo	96
2.2.2. Análise de colonização	98
2.2.3. Observações morfológicas	99
2.3. RESULTADOS	100
2.4. DISCUSSÃO	108

CAPÍTULO 3

FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A RAÍZES DE <i>Gaylussacia brasiliensis</i> (ERICACEAE) EM RESTINGA DO SUL DO BRASIL	115
---	------------

RESUMO	115
3.1. INTRODUÇÃO	116
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	118
3.2.1. Coletas de campo e isolamento de fungos	118
3.2.2. Caracterização de morfoespécies e morfotipos	119
3.2.3. Extração de DNA e PCR	120
3.2.4. Sequenciamento Sanger e análise filogenética	121
3.2.5. Experimento de colonização endofítica	122
3.2.6. Forma de transmissão	123
3.3. RESULTADOS	124
3.3.1. Caracterização dos morfotipos	124
3.3.2. Taxonomia polifásica	129

3.3.3. Avaliação da colonização endofítica	142
3.3.4. Forma de transmissão	151
3.4. DISCUSSÃO	151
4. DISCUSSÃO GERAL	159
REFERÊNCIAS	163
APÊNDICE A - Cronograma e informações sobre as atividades de campo em biologia reprodutiva	193
APÊNDICE B - Dossiê da mariposa beija-flor <i>Aellopos ceculos</i>	194
APÊNDICE C - Características macroscópicas das colônias para transformação de variáveis nominais em numéricas	200
APÊNDICE D - Sequências dos isolados analisados – ITS1/ITS4	201
ANEXO A - Mapa de distribuição de coletadas de <i>Gaylussacia brasiliensis</i>	203
ANEXO B - Registro em herbários de coletas de <i>Gaylussacia brasiliensis</i> em Santa Catarina	204
ANEXO C - Série de eventos que ocorrem durante a formação da associação de micorrizas ericóides nas raízes dos cabelos de Ericaceae. Os estágios incluem iniciação, estabelecimento e degeneração, com duração de até 11 semanas	205

1. INTRODUÇÃO

As ações da FAO (Food and Agriculture Organization), órgão da Nações Unidas sobre biodiversidade para alimentação e agricultura, levam em consideração alguns desafios, e entre eles está a perda de recursos naturais e a incerteza associada as mudanças climáticas. Para lidar com este tema se reconhece que, será necessário um grande reservatório de diversidade biológica. A FAO considera ainda fatores fundamentais que menos de 1% das mais de 80.000 espécies arbóreas, foram estudadas para uso potencial, e que os micro-organismos são elementos-chave para os serviços ecossistêmicos, no entanto, suas contribuições são ainda pouco conhecidas e reconhecidas. Um dos focos adotados é a conservação e uso sustentável de recursos genéticos de plantas com fortes vínculos entre conservação, melhoramento de plantas e desenvolvimento do setor de sementes (FAO, 2017).

A biodiversidade do solo é um foco importante, sabendo que estes organismos vivos, entre eles os micro-organismos (bactérias, fungos, protozoários e nematoides) contribuem com uma ampla gama de serviços essenciais para a função sustentável de todos os ecossistemas. Eles atuam como os principais agentes de direção da ciclagem de nutrientes, regulando a dinâmica da matéria orgânica do solo, o sequestro de carbono e as emissões de gases de efeito estufa, modificando a estrutura física do solo e os regimes de água, aumentando a quantidade e a eficiência da aquisição de nutrientes pela vegetação e aumentando a saúde vegetal. Esses serviços não são apenas essenciais para o funcionamento dos ecossistemas naturais, mas constituem um recurso importante para a gestão sustentável dos sistemas agrícolas (FAO, 2017).

Tendo em vista a importância de contribuir para o conhecimento da biodiversidade brasileira e sua complexa rede de relações se desenvolveu a presente pesquisa. O principal objeto de estudo é a planta da família Ericaceae *Gaylussacia brasiliensis* Meisn., popularmente chamada de camarinha. Esta espécie é um importante alvo para conservação, por ser um recurso genético subutilizado, com potencial de uso alimentar, medicinal e ornamental. Ela produz frutos com gosto ácido e pigmentação escura (Fig. 1), sendo popularmente utilizada na alimentação humana (GANDOLFO; HANAZAKI, 2014). Estudos indicam uso potencial como medicinal e nutracêutica pela presença de triterpenos, compostos fenólicos, vitamina C e bioflavonóides (AGGARWAL et al., 2004; ANTÔNIO, 2004; BRAMORSKI et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011; SOUZA-FAGUNDES et al., 2002).

Figura 1 - Parque municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, Florianópolis.
(A) Vegetação de Restinga em dunas fixas, com *Gaylussacia brasiliensis* (setas).
(B a E) Aspectos de *G. brasiliensis*; (B) planta em solo arenoso; (C) flores e frutos imaturos; (D) cachos com frutos imaturos, (E) e frutos maduros.



G. brasiliensis é amplamente distribuída em diferentes biomas brasileiros, fato que indica seu sucesso adaptativo. Fatores ecológicos e traços da história de vida podem afetar a distribuição da diversidade genética dentro e entre populações de plantas. A manutenção da diversidade genética é um dos principais focos da biologia da conservação, por fornecer a informação sobre o potencial adaptativo e evolutivo de uma espécie (BARRETT; KOHN, 1991). Estudos detalhados da ecologia, biologia populacional, genética, e biologia reprodutiva da espécie-alvo são essenciais para o sucesso da conservação (LANDE, 1988).

Autoecologia é um ramo da Ecologia introduzido por Carl Schröter em 1886, e apresentado a comunidade científica em 1910, durante o “III Congresso Internacional de Botânica”, em Bruxelas. A autoecologia estuda as espécies a partir de suas relações com o meio ambiente, fatores abióticos e bióticos, ou seja, as relações com seus organismos associados. Este ramo da ecologia contribuiu com conceitos sobre a constância da interação entre um organismo e seu ambiente, e a adaptabilidade genética de populações às condições ambientais do local onde vivem. Sendo assim, estudos sobre a autoecologia de uma espécie, podem fornecer informações interessantes acerca de como os organismos coevoluíram permitindo a ocupação de nichos com características que tornam difícil a ocupação por outras plantas.

Posto isto, a pergunta norteadora desta pesquisa é, o que fornece valor adaptativo a *G. brasiliensis* e permite seu sucesso na ocupação de diversos biomas? A presente pesquisa objetivou a busca de informações sobre as associações estratégicas com organismos, que fornecem capacidade adaptativa a *G. brasiliensis* (Fig. 2). Buscou-se fornecer subsídios para conservação *circa situm*, ou seja, a conservação pelo uso (BOSHIER et al., 2015; BOSHIER; GORDON; BARRANCE, 2004; CHAZDON et al., 2009; DAWSON et al., 2013; ORDONEZ et al., 2014), pois as populações desta espécie estão em áreas com influência antrópica, se trata de uma espécie com uso potencial e principalmente a conservação desta espécie aponta para a conservação do seu ecossistema. Em Santa Catarina as populações de *G. brasiliensis* estão localizadas em áreas ameaçadas pela pressão antrópica, onde a vegetação vem sendo fragmentada ou suprimida. Algumas dessas populações são constituídas por poucos exemplares, a taxa de germinação das sementes parece ser baixa e aparentemente a mais frequente forma de propagação no ambiente natural é a vegetativa. A conservação pelo uso tem o potencial de fornecer produtos e serviços ecológicos, além de mudar a relação do agente

humano com este tipo de ecossistema, possibilitando que a sucessão da vegetação ocorra mesmo com ação antrópica. Estas ações podem ampliar as áreas remanescentes de vegetação em estágios mais avançados, e mesmo evitar supressões, afinal só conservamos o que conhecemos.

Foram abordados nesta pesquisa a biologia reprodutiva, buscando informações de como *G. brasiliensis* obteve sucesso em se estabelecer amplamente em diversos biomas, e a associação com fungos endofíticos ericóides. Uma vez que se trata de um tema pouco explorado, este estudo teve uma abordagem observacional, ficando o componente experimental como suporte para alcançar os objetivos.

1.1. ESTRUTURA DA TESE

A presente pesquisa, aborda aspectos relacionados a autoecologia de *Gaylussacia brasiliensis*. Primeiramente são descritos aspectos da vegetação de Restinga. Então são introduzidos aspectos gerais da família Ericaceae, as associações estratégicas com polinizadores e fungos, e como a coevolução com esses organismos que lhes proporcionaram plasticidade ecológica. Em seguida é apresentada a espécie estudada, com foco na biologia reprodutiva e questões a serem estudadas. São também introduzidos conceitos e informações sobre associação simbiótica com fungos endofíticos e o estado da arte sobre este tema.

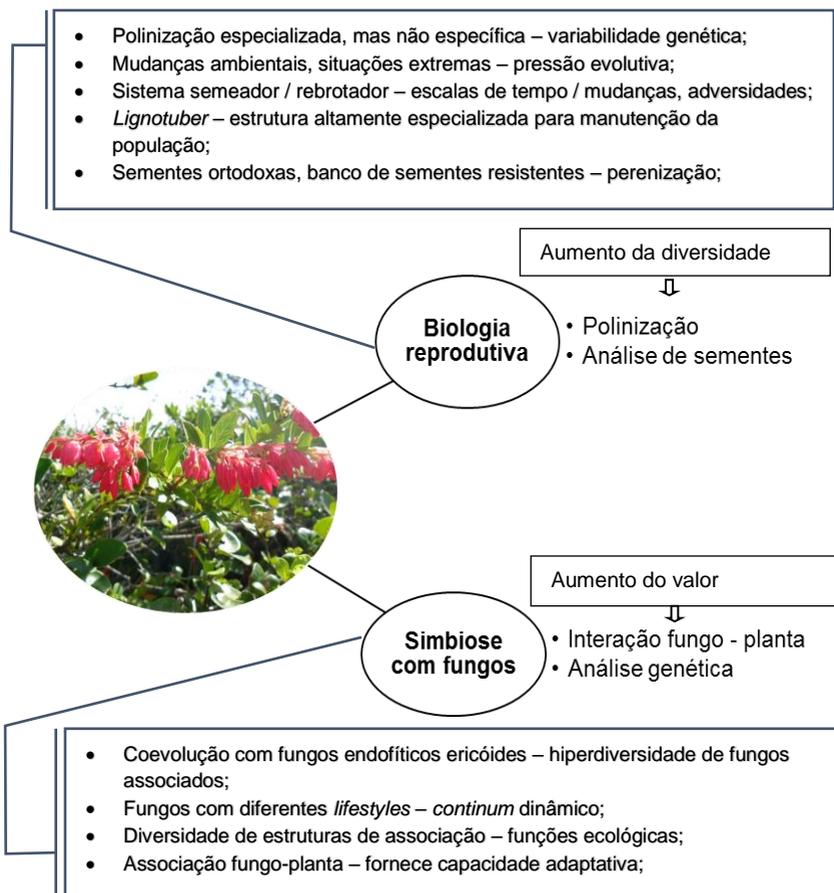
O capítulo 1, apresenta o estudo desenvolvido sobre biologia reprodutiva, a interação com visitantes florais em Restinga, a estratégia evolutiva, por meio de sementes ortodoxas e do *lignotuber*, estrutura subterrânea especializada para propagação vegetativa ainda não descrita para esta espécie.

Nos capítulos seguintes é abordada a associação entre fungos endofíticos ericóides e *G. brasiliensis*, no capítulo 2 a avaliação é realizada diretamente nas raízes coletadas a campo, quantificando a colonização e analisando a estrutura das associações, em áreas com diferentes níveis de impacto antrópico na vegetação. Para estudar os processos que ocorrem na escala de sistema radicular foi realizada primeiramente a descrição anatômica das raízes. Para a avaliação das estruturas de associação e interfaces de fungos endofíticos foram realizadas a análise de colonização nas raízes com utilizando técnicas de microscopia.

No capítulo 3, o estudo proposto é por meio do método de isolamento e cultura, avaliando as características estruturais da associação e relacionando a traços funcionais dos fungos isolados. Para verificar se

o estudo de fungos associados a raízes de *G. brasiliensis* pode fornecer informações sobre a relevância funcional das características morfológicas desta interação. E se é possível estabelecer uma relação entre morfologia e estilo de vida e/ou função ecológica destes endofíticos.

Figura 2 - Fluxograma mostrando aspectos abordados na pesquisa sobre autoecologia de *Gaylussacia brasiliensis*. Indicando as estratégias evolutivas da espécie e suas possíveis consequências para a capacidade adaptativa.



1.2. PERGUNTA DE PESQUISA E OBJETIVOS

Pergunta de pesquisa

Como as associações mutualísticas de *Gaylussacia brasiliensis* afetam o seu valor adaptativo?

Objetivo geral

Investigar aspectos da autoecologia de *Gaylussacia brasiliensis*, as associações estratégicas que incrementam o valor adaptativo, contribuindo com informações para conservação da biodiversidade em ambiente de Restinga.

Objetivos específicos

CAPÍTULO 1

- 1) Caracterizar a biologia reprodutiva de *Gaylussacia brasiliensis*, analisando a relação funcional entre o comportamento de visitantes e o sucesso reprodutivo pela formação de sementes com embrião;
- 2) Comparar os resultados com os do bioma Cerrado;
- 3) Avaliar a viabilidade das sementes ao longo do tempo;
- 4) Descrever a estrutura subterrânea por meio da qual ocorre a propagação vegetativa.

CAPÍTULO 2

- 5) Caracterizar a associação entre fungos endofíticos e micorrízicos nas raízes de *Gaylussacia brasiliensis* em área de Restinga, com mudança da composição da comunidade vegetal, avaliando a estrutura de associação.

CAPÍTULO 3

- 6) Investigar fungos isolados das raízes de *Gaylussacia brasiliensis*, avaliar as características estruturais destas associações e relacionar aspectos morfológicos como indicativos de estilo de vida e/ou funções ecológicas.
- 7) Avaliar a formação de associações endofíticas nas raízes de *G. brasiliensis*, quando inoculados fungos isolados da mesma espécie.

2. VEGETAÇÃO DE RESTINGA, BIOMA MATA ATLÂNTICA

O Bioma Mata Atlântica é altamente impactado pela ação antrópica, atualmente está entre as florestas tropicais mais ameaçadas. Sua conservação é prioritária a nível global, principalmente por se tratar de um dos *hotspots* da biodiversidade mundial.

De acordo com o mapa fitogeográfico do Estado de Santa Catarina a cobertura florestal do Estado, chamada de Mata Atlântica, está subdividida em Floresta Pluvial da Encosta Atlântica, Floresta de Araucária ou dos Pinhais e Floresta Subtropical da bacia do Rio Uruguai (KLEIN, 1978).

A Floresta Pluvial da Encosta Atlântica, também conhecida como Floresta Ombrófila Densa (FOD), cobria originalmente 29.282,00 km², juntamente com seus ecossistemas associados, manguezais e restingas, com 1.999,05 km², correspondendo a aproximadamente 33% do território catarinense. Da área original de Floresta Ombrófila Densa restam cerca de 40,5%, distribuídos em remanescentes florestais primários ou em estágio avançado de regeneração (VIBRASNS et al., 2012). A maior extensão da área ainda coberta por florestas no Estado de Santa Catarina é representada por fragmentos de FOD.

A Restinga, ecossistema associado a FOD, é considerado um ecossistema frágil e de baixa capacidade de resiliência. Isso se deve principalmente às condições edáficas, com solos arenosos e lixiviados. Segundo a Resolução 07 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 1996), entende-se por vegetação de Restinga o conjunto das comunidades vegetais, fisionomicamente distintas sob influência marinha e fluviomarinha. Essas comunidades, distribuídas em mosaico, ocorrem em áreas de grande diversidade ecológica, sendo consideradas comunidades edáficas por dependerem mais da natureza do solo que do clima.

Essas formações, para efeito da Resolução 07 CONAMA (1996), são divididas em: Vegetação de Praias e Dunas, Vegetação Sobre Cordões Arenosos e Vegetação Associada às Depressões. Na Restinga os estágios sucessionais diferem das formações ombrófilas e estacionais, ocorrendo notadamente de forma mais lenta, em função do substrato que não favorece o estabelecimento inicial da vegetação, principalmente por dessecação e ausência de nutrientes. O corte da vegetação ocasiona uma reposição lenta, geralmente de porte e diversidade menores, e algumas espécies passam a predominar. Dada a fragilidade desse ecossistema, a vegetação exerce papel fundamental para a estabilização de dunas.

Segundo Gomes e Pereira (2011), as principais evidências de fragilidade ou vulnerabilidade natural dessas áreas estão associadas, principalmente, a aspectos físicos, químicos e biológicos do solo. As perturbações naturais causam alteração ou mudança de padrões, contribuindo para o desequilíbrio do ambiente de uma forma sistemática.

As áreas de praias e dunas estão em contínua modificação pela ação dos ventos, chuvas e ondas. A vegetação se caracteriza como em constante e rápido dinamismo, mantendo-se sempre como vegetação pioneira de primeira ocupação (clímax edáfico), também determinado por marés, não sendo considerados estágios sucessionais. Nas dunas normalmente não ocorre dominância e a diversidade de espécies é baixa, e na lista de espécies indicadoras está *G. brasiliensis*: ela é indicadora de vegetação primária/original e estágio avançado de regeneração do escrube na Vegetação sobre Cordões Arenosos (CONAMA, 1996).

A resolução 447 CONAMA (2011) cita *G. brasiliensis* como indicadora de vegetação de clímax em Vegetação Herbácea e Subarbusciva de Restinga, e de estágios primário e avançado de regeneração em Vegetação arbustiva de Restinga no Estado do Paraná. Também na resolução 423 CONAMA (2010), *G. brasiliensis* aparece como espécie indicadora de vegetação primária e dos estágios médio e avançado de regeneração nos Campos de Altitude associados ou abrangidos pela Mata Atlântica.

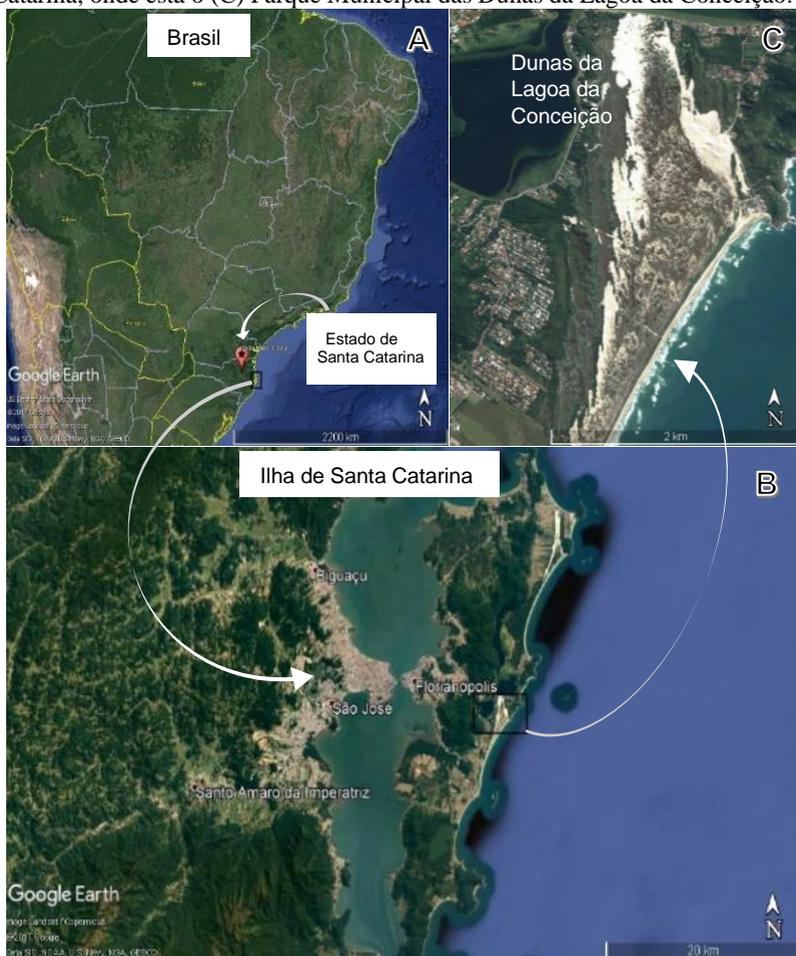
2.1. PARQUE MUNICIPAL DAS DUNAS DA LAGOA DA CONCEIÇÃO

Nas dunas da Ilha de Santa Catarina foi criado o Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, por meio dos Decretos nº 1.261 de 23/05/1975 e nº 213 de 14/12/1979 e nº 231 de 16/09/1988, (CECCA, 1997), com aproximadamente 500 ha de Restinga, possui fitofisionomias herbáceo subarbuscivas, arbustivas e arbóreas. A criação do parque foi importante para a conservação, pois esse ecossistema tem sido ameaçado pela pressão antrópica a algumas décadas. Além disso tem sido desenvolvido estudos científicos nesse ecossistema com características peculiares (CORDOBA et al., 2001; GUIMARÃES, 2006; STÜRMER; BELLEI, 1994; STÜRMER; STÜRMER; PASQUALINI, 2013).

Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição (Lat. 27°37'48"S Long. 48°27'56"O e Lat. 27°36'33"S Long. 48°27'20"O), em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (Fig. 3).

O setor leste de Florianópolis, onde está localizado o parque, se caracteriza por ser um sistema aberto, de alta energia, sujeito diretamente à dinâmica do Oceano Atlântico. A área do parque se caracteriza por ser uma extensa planície costeira, com dois campos de dunas, o das Aranhas (Nordeste) e o da Joaquina (Sudeste) (CASTELLANI, 2003), este com aproximadamente 3,5 km de comprimento e largura entre 1,2 a 2,0 km. Esses depósitos arenosos são de origem pleistocênica e holocênica e formam o principal complexo de dunas móveis e semifixas da Ilha da Santa Catarina (BRESOLIN, 1979; CECCA, 1996).

Figura 3 - (A) Brasil, mostrando o Estado de Santa Catarina; (B) Ilha de Santa Catarina, onde está o (C) Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição.



As dunas se caracterizam por ter solo Neossolo Quartzarênico e vegetação de Restinga. As estações do ano na Ilha de Santa Catarina são bem definidas. De acordo com a classificação de Strahler, a Ilha possui clima do tipo subtropical úmido e está inserida na região de clima temperado de categoria subquente (CECCA, 1996). O parque está entre 0 e 30 m de altitude e abrange campo de dunas móveis, fixas e semifixas.

O clima é *Cfa* mesotérmico úmido com verões quentes e chuvas bem distribuídas ao longo do ano, com precipitação média anual de aproximadamente 1600 mm, segundo a classificação de Köppen-Geiger (KOTTEK et al., 2006). A média anual de umidade relativa do ar é de 82%. A média da temperatura anual é de 21 °C, sendo janeiro o mês mais quente com temperaturas máximas variando de 28 a 33 °C, e julho o mês mais frio com temperaturas mínimas variando de 7,5 a 12 °C.

Guimarães (2006), observou a florística na Restinga do Parque das Dunas da Lagoa da Conceição, avaliando por habitat e classe de abundância, nos habitats praia, dunas frontais, internas móveis e baixadas alagadas. O autor não encontrou *G. brasiliensis*, em dunas internas fixas apareceu de forma ocasional, em dunas internas semifixas foi comum, e baixadas secas foi abundante, não foi avaliada a abundância dessa planta em baixadas úmidas.

3. AUTOECOLOGIA DE *Gaylussacia brasiliensis*

Gaylussacia brasiliensis Meisn. é uma planta eudicotiledônea, pertencente à família Ericaceae, subfamília Vaccinioideae, tribo Vaccinieae. Essa espécie é nativa do Brasil, popularmente conhecida como camarinha, é uma planta arbustiva com capacidade de colonizar e se adaptar à ambientes diversos com características edáficas e climáticas severas, tais como solo ácido e pobre em nutrientes, salinidade alta e vento constante. As ericáceas são em geral oportunistas de habitats perturbados, e podem possuir função ecológica como colonizadoras ou pioneiras em ambientes instáveis.

As ericáceas neotropicais sofreram especiação dinâmica e extensa radiação adaptativa (LUTEYN, 2002). A elevação das montanhas andinas causou um processo geológico complexo, que ocasionou isolamento de populações, resultando na grande biodiversidade de espécies (GENTRY, 1982). A formação da Cadeia Andina, juntamente com as mudanças climáticas do pleistoceno, ofereceu a oportunidade para a especiação explosiva entre as famílias, com as pré-adaptações evolutivas necessárias para a exploração dos nichos arbustivo, epifítico e sub-bosque (LUTEYN, 2002). Cullings (1996) formulou a hipótese de que a formação de micorrizas ericóides ocorreu em um único evento evolutivo em Ericaceae.

Segundo Gentry (1982), espécies da tribo Vaccinieae coevoluiram com organismos polinizadores, dando suporte para o argumento de que mudanças nos polinizadores específicos estão ligadas a um modo comum de especiação e coevolução.

A região andina tropical abriga aproximadamente 73% de todas as ericáceas neotropicais descritas, sendo que 95% das ericáceas andinas são endêmicas e pertencem à monofilética Clade Andina (KRON et al., 2002). A Clade Andina é considerada um grupo jovem, que evoluiu na América do Sul durante a elevação das montanhas andinas com a diversificação desde o final do Mioceno (LUTEYN, 2002; KRON; LUTEYN, 2005). Os ancestrais são presumivelmente Vaccinioideae norte-americanos de áreas abertas (KRON; LUTEYN, 2005). As ericáceas deste grupo colonizaram o sub-bosque da floresta tropical de montanha, e crescem preferencialmente como epífitas ou hemiepífitas.

Segundo Luteyn (2002), as ericáceas neotropicais são adaptadas a ambientes úmidos e frios entre 1.000 e 3.000 metros acima do nível do mar. Elas evoluíram com uma tolerância a intensidades de luminosidade alta e baixa, umidade constante, temperaturas amenas e solos ácidos, condições encontradas principalmente em regiões de clima tropical de

altitude e úmidos, particularmente na região biogeográfica Andino Tropical. As ericáceas são frequentes em habitats com solos ácidos na região neotropical, amostras de solos andinos que suportam ericáceas têm normalmente pH de 4 a 5 (LUTEYN; SYLVA S, 1999).

Ericáceas neotropicais são caracteristicamente heliófilas, nas condições de pouca luz, dentro de floresta primária, normalmente não florescem nem produzem frutos (LUTEYN, 2002). Elas florescem onde há clareiras, bordas da floresta ou margens dos rios. Algumas populações dentro da floresta podem se tornar escandente ou lianóides para atingir as maiores intensidades de luz do dossel superior. Em ambientes florestais elas são mais abundantes ao longo das bordas, nas encostas expostas recentemente por deslizamentos de terra ou cortes de estrada, ou como epífitas nas árvores remanescentes em pastagens. Além disso, nos trópicos a folhagem tende a ser esclerófila, mais resistente a danos, e com vida mais longa do que em regiões temperadas.

O crescimento vegetativo e floração são mais contínuos ao longo do ano em habitats sem estações definidas. A faixa de temperatura preferida pelas ericáceas neotropicais é mais fria, mas não toleram congelamento, como é evidenciado pela ocorrência de apenas algumas espécies abaixo de 1.000 m e acima de 3.000 m (LUTEYN, 2002).

A precipitação é um fator chave para explicar a distribuição de ericáceas neotropicais, por elas terem dependência ecofisiológica à umidade (LUTEYN, 2002). Dentro de gêneros do grupo Clade Andina, existem também algumas adaptações morfológicas relacionadas às condições de estresse hídrico moderado, como epifitismo ou em pastagens, clareiras, topos de morro, e outros locais sazonalmente secos ou onde os ventos podem ser constantes e há dessecação. Estas adaptações incluem folhas coriáceas, com cutículas espessas e uma superfície superior brilhante, flores que são suculentas e muitas vezes possuem *lignotuberes* (LUTEYN, 2002). Algumas espécies com ovários ínferos, do gênero *Vaccinium* e *Gaylussacia* (Vaccinioideae: Vaccinieae) parecem preferir locais xéricos.

O gênero *Gaylussacia* é tipicamente americano e reúne 63 espécies, sendo 52 delas nativas do Brasil. Entre as espécies do gênero no Brasil, apenas *G. brasiliensis* apresenta um padrão mais amplo de distribuição geográfica, em altitudes de 0 até 2.035 metros (ROMÃO, 2011). *G. brasiliensis* ocorre na região norte em Tocantins, na região nordeste em Alagoas, Bahia, Pernambuco, na região centro-oeste no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, na região sudeste no Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, e na

Região Sul no Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Anexo A). Os biomas de ocorrência de camarinha são Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Esta espécie aparece nas vegetações do tipo Campo de Altitude, Campo Rupestre, Carrasco, Cerrado, Floresta Ciliar ou Galeria, Restinga e vegetação sobre afloramentos rochosos (ROMÃO, 2011).

Em Santa Catarina estão relatadas quatro espécies do gênero *Gaylussacia*: *G. brasiliensis*, *G. angustifolia*, *G. pseudogaultheria* e *G. corvensis*, sendo essa última endêmica do estado (ROMÃO; KINOSHITA, 2010). Reitz (1961) relatou *G. brasiliensis* e enfatizou que “é notável o fenômeno da presença, na Restinga, de plantas do planalto”, incluindo *G. brasiliensis*. No Inventário Florístico de Santa Catarina *G. brasiliensis* é citada na lista geral florística da floresta ombrófila densa (VIBRANS et al., 2013a), e também na lista de espécies coletadas na Restinga e na floresta ombrófila mista (VIBRANS et al., 2013b) (Anexo B). O primeiro registro em herbário, de coleta de *G. brasiliensis* para Santa Catarina foi em Florianópolis no ano de 1938 (HERBARIUM ANCHIETA PACA-AGP, 2016).

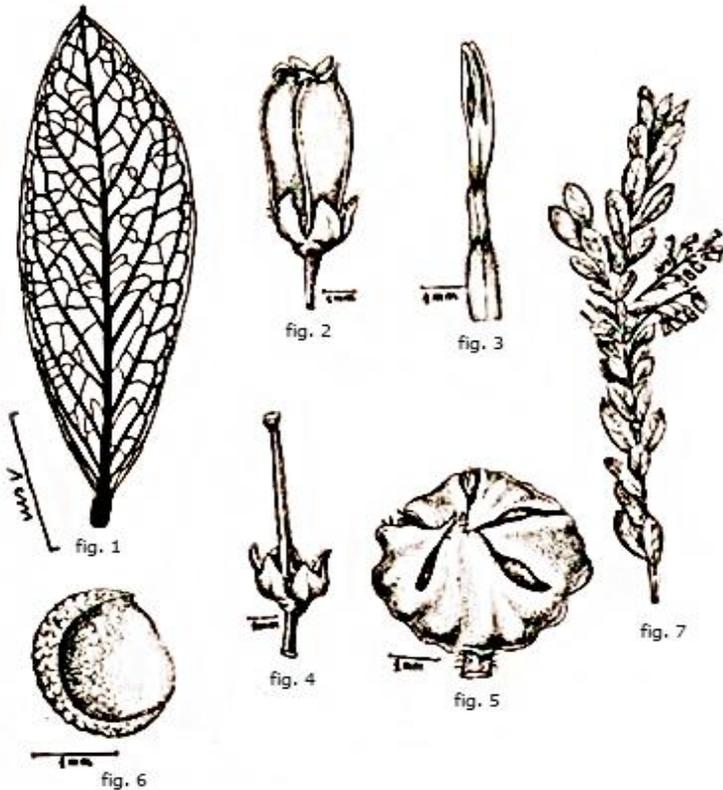
O gênero *Gaylussacia* é monofilético, sendo prováveis sinapomorfias o ovário decalocular, os lóculos uniovlados e o fruto tipo nuculânio (ROMÃO, 2011). Marques e Klein (1975) caracterizam o gênero *Gaylussacia* por possuir ovário ínfero aderido às paredes do receptáculo e anteras bifidas com ápice tubuloso-acuminado (Fig. 4). As flores são pentâmeras, rosas ou escarlates, dispostas em racemos axilares, pedicelo protegido por bráctea subfoliácea, e uma ou duas bractéolas. Estames em número de 10, inclusos na altura do estigma ou superando-o. O ovário com 10 lóculos monospemos, fruto drupa subglobosa, glabra, circundada no ápice, pelos lóbulos do cálice, azul-escuro, com 10 (ou 8 por aborto) sementes lenticulares, suborbiculares e endocarpo liso. A espécie *G. brasiliensis* está definida por possuir corola urceolada constricta no ápice.

Romão (2011) destacou que *G. brasiliensis* possui grande plasticidade ecológica e fenotípica. A plasticidade fenotípica dessa espécie se expressa através do tamanho e arquitetura diversa, a planta é descrita com altura entre 0,15 a 4,0 m. Possui folhas com diferentes tamanhos e formas, que variam de glabras, pubescentes a setosas. O tamanho e forma refletem o estresse experimentado pelos indivíduos da espécie, sendo mais importantes que a idade para determinar as chances de sobrevivência de uma planta jovem até o estágio adulto.

Ao longo do tempo *G. brasiliensis* foi classificada taxonomicamente de diversas formas, entre espécies e variedades. Romão

(2011) sugere duas variedades *G. brasiliensis* var. *brasiliensis* e *G. brasiliensis* var. *nervosa*, e ainda a forma “glandulosa”. O autor indica que este último táxon necessita mais estudos, pois pode ser apenas uma variação morfológica da variedade *brasiliensis*.

Figura 4 - *Gaylussacia brasiliensis* Meisn. (1) aspecto geral da enervação da lâmina foliar; (2) flor; (3) estame; (4) cálice ovário estilete; (5) fruto; (6) semente; (7) hábito.



Fonte: Marques e Klein (1975).

Natureserve (2017) relata espécies de *Gaylussacia* com estatos global, de dez espécies avaliadas, duas estão com algum nível de risco. Nos Estados Unidos, *G. orocola* está classificado como criticamente em perigo (G1), pelo endemismo e alteração e destruição do habitat. A espécie *G. brachycera* (box huckleberry) está classificada como

vulnerável (G3), foi encontrado baixo número de indivíduos genéticos (<100), o que é de alguma forma compensado pelo tamanho substancial e persistência da maioria dos clones, no entanto, a taxa de germinação é muito baixa e as mudas não tem vigor, sendo sua reprodução aparentemente apenas assexuada (NATURESERVE, 2017).

No Brasil, de treze espécies do gênero *Gaylussacia* avaliadas, onze estão em diferentes níveis de situação de risco, dentre elas estão criticamente em perigo (CR), *G. pruinosa*, *G. retivenia* e *G. setosa*; estão em perigo (EN), *G. angulata*, *G. caparoensis*, *G. centunculifolia* e *G. oleifolia*; está vulnerável (VU), *G. harleyi*; e estão quase ameaçadas (NT) *G. decipiens*, *G. retusa* e *G. vitis-idaea* (CNCFLORA, 2017). As razões para o risco são basicamente o endemismo e a distribuição restrita, geralmente em áreas com atividade antrópica impactante.

Não existe informações de risco para *G. brasiliensis*, mas acredita-se que pela ampla distribuição e alta capacidade adaptativa, ela a princípio não esteja em risco de forma geral, pode sim estar ameaçada de desaparecer em alguns lugares, pois as populações são suprimidas pela ação antrópica.

3.1. BIOLOGIA REPRODUTIVA EM ERICACEAE

As flores da grande maioria das ericáceas são perfeitas, tendo estames e peças pistiladas aparentemente funcionais (LUTEYN; PEDRAZA-PENALOSA, 2012). As síndromes de polinização das ericáceas neotropicais, indicam tendência para que ocorra polinização cruzada, onde o pólen de uma flor fecunda o estigma da flor de outro indivíduo, pois em várias espécies são necessárias visitas de polinizadores para a reprodução. Segundo Araújo et al. (2011) ericáceas são fortemente protândricas, com pólen maduro na pré-antese, que por vezes derrama dentro do botão, com o estigma receptivo na pré-antese e depois das flores abertas.

Segundo Gentry (1982) espécies da tribo Vaccinieae coevolúram com aves beija-flores, sendo assim, o aumento do número de espécies e a porcentagem de endemismo de Vaccinieae estão relacionados à diversidade de beija-flores. Beija-flores são polinizadores confiáveis porque podem se alimentar mesmo em condições adversas, com vento, frio e chuva (LUTEYN; SYLVA, 1999). Em geral, a morfologia e padrão de cores de flores de Vaccinieae neotropicais são típicas da síndrome de plantas polinizadas por beija-flores, visto que elas tendem a ser brilhantes, coloridas, tubulares e inodoras.

Segundo Luteyn (2002), a polinização de Ericaceae nas latitudes temperadas e subtropicais é principalmente entomófila, com insetos em busca de néctar, de pólen, ou ambos. Cane et al. (1985) verificou que *Vaccinium stamineum* requer visitas florais por insetos e, concluiu que *Melitta americana* é o polinizador primário dessa espécie, várias abelhas visitam as flores, mas a maioria das espécies são: infrequentes, polipépticas (ampla gama de hospedeiros para o pólen), ou vão em busca de néctar e não são importantes como vetores de pólen. Em Restinga do Rio de Janeiro, foi observado *Agarista revoluta* (Ericaceae), sendo polinizada por insetos noturnos e diurnos (MOREIRA; MIRANDA; LIMA, 2017). Kraemer (2001) observou em *Bejaria resinosa* um alto grau de autocompatibilidade, longo período de antese, e flores visitadas por abelhas, com frequências muito mais altas do que por beija-flores, e as abelhas parecem ser os polinizadores mais efetivos. No entanto, os beija-flores, ainda podem desempenhar um papel importante para a polinização de longa distância, o pico de floração na estação seca e o néctar altamente concentrado podem ser julgados como pré-condições para uma mudança para polinização por abelhas grandes (KRAEMER, 2001).

Segundo Araújo et al. (2011) as flores de *G. brasiliensis* são autocompatíveis e hercogâmicas, mas exigem polinizadores ativos, por não apresentarem autopolinização espontânea e nem apomixia. Elas possuem anteras poricidas, mas apresentam poros amplos que são relativamente grandes quando comparado aos das anteras de flores melitófilas. Em *G. brasiliensis*, a posição pendente da flor por si só é um facilitador da liberação de pólen, ocorrendo a síndrome de polinização por vibração. Desta forma, os visitantes florais precisam produzir vibrações e alcançar a câmara nectarífera para liberar pequenas cargas de pólen e transportar esse para outras flores.

Quanto à fenologia reprodutiva, *G. brasiliensis* floresce e frutifica o ano todo (SILVA; CERVI, 2006), no entanto isso parece depender de condições ambientais específicas, pois a literatura mostra períodos diferentes de frutificação. Em Florianópolis, nas Dunas da Lagoa da Conceição, (GUIMARÃES, 2006), observou *G. brasiliensis* florescendo todos os meses do ano. Zamith e Scarano (2004) observaram frutificação de agosto a abril em Restingas do Rio de Janeiro. Na Bahia, Moraes (2011) observou *G. brasiliensis* florescendo de junho a abril e classificou o padrão fenológico e frutificação como anual intermediário.

Segundo Araújo et al. (2011), em borda de mata de galeria em Minas Gerais, a síndrome de polinização é ornitófila e a dispersão

zoocórica, eles observaram floração do tipo contínuo com pequenas pausas ao longo do ano e a duração de floração estendida, por mais de cinco meses. O padrão de distribuição de floração estendida, assim como a longevidade das flores, de até 4 dias, são estratégias para manutenção e atração dos polinizadores, permitindo uma previsibilidade (ARAÚJO et al., 2011).

No município de Morro do Pilar, Minas Gerais, Rodrigues (2011) observou em campo rupestre *G. brasiliensis* sendo visitada pela espécie *Augastes scutatus* (Throchilinae), beija-flor. Em bordas de mata de galeria em Minas Gerais, Araújo et al. (2011) observaram flores de *G. brasiliensis* sendo visitadas pelos beija-flores *Chlorostilbon lucidus* (Shaw), *Amazilia fimbriata* (Gmelin), *Hylocharis chrysura* (Shaw) (Throchilinae) e *Phaethornis pretrei* (Lesson & De Lattre) (Phaethornithinae).

Kohler (2011) observou *G. brasiliensis* na cota entre 850 e 1.100 m em Mata Atlântica no município de Nova Trento, Santa Catarina, sendo visitada por *Stephanoxis lalandi* (Vieillot) (Throchilinae). Araújo et al. (2011) colocam que o comportamento dos beija-flores pode ser variável, dependendo da oferta de flores, ficando mais restrito a um grupo de flores, quando este oferece as calorias necessárias, ou sendo mais amplo, com visitas a flores em diferentes grupamentos.

Araújo et al. (2011), observaram também abelhas *Trigona* sp. e *Bombus* sp. e sugeriram que estas estavam pilhando néctar pela base da flor. Segundo Navarro (1999), o roubo do néctar significa um alto custo energético para a planta, pois a planta precisa repor o néctar removido pelos pilhadores o que resulta em menos néctar disponível para os polinizadores. O resultado pode ser um aumento no *fitness* da planta se os polinizadores respondem à diminuição de recursos buscando por flores mais distantes.

Em relação aos dispersores, poucas informações foram encontradas para *G. brasiliensis*. Frutos das ericáceas neotropicais são geralmente pequenos, carnosos e geralmente azul-escuros a pretos, sendo provavelmente dispersos por aves ou mamíferos (LUTEYN; PEDRAZA-PEÑALOSA, 2012). Moraes (2011) indicou que, quanto às síndromes de dispersão, *G. brasiliensis* apresentou características de seus diásporos associadas à zoocoria. Cestari e Pizo (2013) encontraram os frutos de *G. brasiliensis* na dieta do pássaro *Manacus manacus* (Linnaeus) em Restingas no estado de São Paulo. Manhães (2003) observou pássaros de espécies da família Emberizidae, a subfamília Thraupinae, se alimentando dos frutos de camarinha.

Uma baixa taxa de germinação de sementes tem sido observada em *G. brasiliensis* (SANTOS; HEBERLE; LOVATO, 2013; ZAMITH; SCARANO, 2004). O tempo médio de germinação foi de 60 dias e a média de germinação foi de 22 a 26 % com polpa e 6 % sem polpa, com percentual médio de sobrevivência de 43 % (CARRASCO et al., 2012). Santos, Heberle e Lovato (2011), realizaram testes de germinação *in vitro*, caixas Gerbox e casa de vegetação, obteve 10 %, 4,5 % e 24 % respectivamente. Não observaram quebra de dormência em testes *in vitro* com ácido giberélico e ácido sulfúrico e concluiu que a forma mais eficiente de multiplicar *G. brasiliensis* é pelo método de estaquia de ramos herbáceos retirados de caules subterrâneos, com aplicação do fitormônio ácido Indolbutírico (AIB).

Luteyn (2002) cita que a reprodução vegetativa em ericáceas neotropicais, em ambientes muito úmidos, é por meio de rizomas ou raízes adventícias ao longo do caule, ou *lignotuberes*. Extensivos sistemas de rizomas em algumas espécies podem formar grandes clones, e muitas espécies formam colônias extensas desta forma.

A principal forma de propagação de *G. brasiliensis* em ecossistemas naturais parece ser a reprodução vegetativa por meio de *lignotuberes*, no entanto, não foi encontrado informação sobre essa estrutura nessa espécie. A propagação vegetativa pode não estar garantindo a variabilidade genética, formando populações clonais. Por outro lado, sementes vazias e baixa germinação, podem estar indicando problemas reprodutivos. Sendo assim, parte dessa pesquisa se desenvolveu buscando avaliar características reprodutivas, apontando para estratégias evolutivas da camarinha.

3.2. FUNGOS ASSOCIADOS A ERICACEAE

Inicialmente, a descrição da estrutura de “micorriza ericóide” por Harley (1959) reforçou a ligação desses fungos com uma estrutura anatômica particular, exclusiva da ordem de angiospermas Ericales (Ericaceae, Epacridaceae e Empetraceae). No entanto, diversos fungos têm sido relatados em raízes de ericáceas, os mais frequentes pertencem aos filos Ascomycota e Basidiomycota, formando associações dos tipos micorrízica ericóide (ErM), endofítica (DSE e EF), e micorrízica arbuscular (AMF).

A família Ericaceae é caracterizada por possuir associação simbiótica com fungos formadores de micorrizas ericóides (SMITH; READ, 2008). Cabe aqui ressaltar que, simbiose é considerado uma

interação fisiológica ou estruturalmente íntima entre organismos filogeneticamente não relacionados, sem implicar um efeito específico da aptidão em nenhum dos organismos, pode ser mutualista, antagônica ou comensal (AGUILAR-TRIGUEROS et al., 2014).

As ErMs caracterizam um tipo especializado de ectendomicorrizas, em que se formam novelos densos de hifas, contidos nas células rizodermas ou corticais em raízes capilares, que possuem uma anatomia simples e vida útil efêmera. As células epidérmicas que contêm complexos de hifas, possuem núcleo alargado e são ricas em organelas, incluindo mitocôndrias, plastídios e componentes do sistema endomembranar (PETERSON; MASSICOTTE; MELVILLE, 2004). O micélio extra radicular de fungos ErM não atinge mais do que alguns milímetros da superfície da raiz para o solo circundante. Micorrizas ericóides normalmente não têm rede de Hartig e haustórios, nem mantos com várias camadas de hifas (PETERSON; MASSICOTTE; MELVILLE, 2004). No entanto, foram observadas bainha de hifas, colonização intercelular e intracelular em diferentes ericáceas neotropicais (MASSICOTTE; MELVILLE; PETERSON, 2005a; RAINS; NADKARNI; BLEDSOE, 2003; SETARO; KOTTKE; OBERWINKLER, 2006).

Nas últimas três décadas vários estudos sobre micorrizas ericóides tem fornecido informações sobre a natureza destes fungos. As principais linhas de pesquisa focam a capacidade infecciosa de certos fungos, a receptividade dos potenciais hospedeiros, as características morfológicas únicas para determinadas espécies, as relações filogenéticas das espécies de fungos e estirpes, as funções ecológicas de espécies estreitamente relacionadas e fungos ericóides potenciais. No entanto, Luteyn (2002) observou que existem poucos estudos sobre micorrizas em ericáceas neotropicais. Essas plantas dependam fortemente de fungos endofíticos, principalmente para aquisição de nutriente da matéria orgânica do solo. Existem poucos estudos sobre o gênero *Gaylussacia*, Bachelier (2014), observou a dominância do fungo ericóide *Oidiodendron* sp. nas raízes de *G. baccata* em relação a *Rhizoscyphus ericae* e utilizou métodos de cultivo de raízes extraídas do campo em experimentos de inoculação.

As raízes das ericáceas estão distribuídas em padrão essencialmente superficial no perfil do solo, no qual os fungos estão em contato íntimo com resíduos orgânicos do solo (READ, 1996). Quanto maior a restrição de nutrientes no solo, mais importante é o envolvimento da associação com fungos nas raízes para os processos de mobilização dos nutrientes. Pesquisas sobre *Rhizoscyphus ericae*, o mais conhecido e

bem estudado dos fungos micorrízicos ericóide, revelou a capacidade das espécies de fungos de captação e utilização de muitas formas de nitrogênio (READ, 1996), fósforo inorgânico e orgânico (LEAKE; MILES, 1996) aos quais as ericáceas simbiotes não teriam acesso de outra forma. Os fungos formadores de micorrizas ericóides têm capacidade saprofítica, o que permite a concorrência com microrganismos decompositores, e a possibilidade de envolvimento direto das micorrizas na mobilização de N e P dos resíduos orgânicos, o principal repositório de ambos elementos em alguns ecossistemas em que ocorrem ericáceas (KERLEY; READ, 1995).

Existem alguns relatos sobre a colonização de fungos micorrízicos arbusculares (AMF) em ericáceas. No Havaí, observaram três espécies do gênero *Vaccinium* (Ericaceae) formando micorrizas arbusculares (KOSKE; GEMMA; ENGLANDER, 1990). No Japão, Fukuchi e Obase (2011), avaliaram a colonização das ericáceas, *Empetrum nigrum*, *Ledum palustre*, *Vaccinium vitis-idaea* e *Loiseleuria procumbens*, elas estavam associadas com ErM e com DSE em todos os locais, e em locais dominados por *Sasa senanensis* (Poaceae) observaram também colonização por AMF. *Enkianthus campanulatus* (Ericaceae) foi colonizada predominantemente por AMF e DSE e não tinham associações com fungos ErM (FUKUCHI; OBASE, 2011; OBASE; MATSUDA; ITO, 2013).

A diversidade do habitat e características específicas determinam a função adaptativa da associação mutualística. Read (1996) ressalta que é importante relacionar a diversidade de tipos de habitats com as funções das raízes de ericáceas.

Enquanto há uma lógica aparente no pressuposto de que, uma estrutura uniforme morfologicamente, deve ser uniforme em sua função, também deve-se considerar que estas estruturas têm uma vasta gama de atributos funcionais. Alguns destes atributos são importantes em determinada circunstância ecológica, pois as raízes com micorrizas ericóides fazem parte de uma regulação em solos com baixos teores de nutrientes. Sabe-se que as micorrizas influenciam diretamente na capacidade adaptativa das plantas, além de melhorar o crescimento.

O efeito de associações micorrízicas pode levar a melhorias no condicionamento físico geral da planta (DIGHTON, 2003), esta aptidão melhorada pode proporcionar uma vantagem competitiva para as plantas, espécies ou indivíduos, que respondem mais aos efeitos da colonização fúngica.

Segundo Rodriguez et al. (2009), os benefícios adaptativos que são conferidos às plantas como resultado da simbiose com fungos endofíticos, as tornam altamente reativas, podendo aumentar a dominância nas comunidades vegetais. Os benefícios da simbiose para as plantas podem ser divididos em: não-adaptativos ao habitat (NHA), tolerância à seca e melhoria do crescimento, são comuns entre os endofíticos, independentemente do habitat de origem; e benefícios de adaptação ao habitat (HA), tais como, níveis de pH, temperatura e salinidade, entres outros que resultam em pressões seletivas específicas (RODRIGUEZ et al., 2009).

Apesar da ocorrência comum de fungos endofíticos e micorrízicos, existe pouco conhecimento de importância ecológica desses simbioses. Dada a sua distribuição global e papel proeminente na ciclagem de nutrientes em alguns dos maiores biomas terrestres, a relação mutualística de ericáceas com fungos associados permanecem pouco estudadas. Isso se justifica, de alguma forma, pela complexidade dessas relações, que podem envolver muitos táxons fúngicos, e pelo desenvolvimento recente de ferramentas que permitem estudos moleculares com o mínimo de material genético em amostras ambientais.

3.2.1. Fungos endofíticos e micorrízicos

Micologistas tem utilizado o termo fungos endofíticos para designar fungos que habitam plantas simbioses em algum momento da sua vida, colonizando tecidos internos sem causar sintomas visíveis de doenças na planta. Inicialmente o termo endofítico refere-se aos fungos e outros organismos no momento da detecção, sem levar em conta o estado futuro ou resultado da interação. No entanto, em razão do aumento do reconhecimento da importância dos fungos especializados que habitam plantas, o termo fungo endofítico tem sido utilizado para designar uma categoria específica, que engloba uma vasta gama de microfungos que habitam as raízes e partes aéreas, sem formar as características anatômicas típicas de micorrizas ou causando sinais evidentes de patogenicidade (SCHULZ; BOYLE; SIEBER, 2006).

Estudos mais detalhados de interações entre fungos endofíticos e plantas simbióticas são necessários para elucidar a base funcional das relações ecológicas. Pode ser necessário olhar para além do paradigma tradicional das associações, micorrízicas e patogênica, para compreender os papéis ecológicos desses fungos. Estes fungos endofíticos representam um *continuum* de fungos em relação ao estado fisiológico, modo de

infecção, padrão de colonização, metabolismo secundário, estratégia do ciclo de vida, e estágios de desenvolvimento e evolutivos, mas também em relação ao hospedeiro e táxon fúngico envolvido nas simbioses (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Dada a complexidade destas associações, os táxons fúngicos têm sido classificados em categorias de acordo com critérios específicos. Esses critérios podem ser baseados no aspecto nutricional (biotrófico, necrotrófico ou saprofítico), presença de melanização de hifas e formação de septos (endofíticos septos escuros), ou em uma combinação de características taxonômica, morfológica e fisiológica (micorrízica arbuscular, ectendomicorrízica ou ectomicorrízica). Essas abordagens classificadoras têm sido importantes para a destilação de generalidades a partir da combinação rica de interações de plantas e fungos (AGUILAR-TRIGUEROS et al., 2014). No entanto, esses esquemas de classificação podem fornecer um quadro inicial útil para entender as interações fúngicas-fúngicas mal estudadas, mas as generalizações resultantes geralmente incluem a lista de tantas exceções ao esquema proposto que a estrutura não se torna útil operacionalmente.

A atribuição de categorias fixas é problemática para espécies chamadas endofíticas, alguns dos critérios utilizados na delimitação de classes de endofíticos são quantitativos (número de hospedeiros potenciais, número de co-infecções dentro de um hospedeiro ou grau de colonização de tecido), mas sua delimitação é imprecisa (faixa estreita de hospedeiro versus amplo, baixo versus alto na diversidade de plantas, extensa versus limitada na colonização de planta) (RODRIGUEZ et al., 2009). Da mesma forma, a classificação com base em seus efeitos sobre a aptidão do hospedeiro resultou em conclusão insatisfatória de que "alguns endófitos podem ser patógenos latentes, alguns podem ser derivados de agentes patogênicos e outros podem ser saprófitos latentes, mas muitos não são nem um destes (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011).

Tipos e categorias de micorrizas são definidos por critérios morfológicos, devem designar-se como fungos micorrízicos somente aqueles isolados a partir de uma micorriza, por meios confiáveis, e que pertencem a grupos conhecidos de simbiontes micorrízicos (BRUNDRETT, 2004). Para potenciais fungos micorrízicos, é necessário confirmar a formação de estruturas típicas de micorriza por ressíntese. Ou seja, reinocular o isolado na planta e formar determinada colonização, se isso não acontecer, não estará claro se são fungos endofíticos ou micorrízicos. Para evitar uma classificação morfológica equivocada,

devem ser analisadas porções de plantas que representem o tecido de interesse. É necessário ainda o emprego de técnicas adequadas para a identificação morfológica, como a utilização de corantes específicos para quitina, principal componente da parede fúngica.

A distinção entre atividades de endofíticos e de associações micorrízicas causados pelo mesmo fungo é muitas vezes problemática, especialmente para fungos multifuncionais, que podem se expressar como endofíticos ou como micorrizas. Isso reforça a necessidade de usar definições consistentes de associações micorrízicas, com base na estrutura e desenvolvimento de associações (SCHULZ; BOYLE; SIEBER, 2006).

Segundo Schulz et al. (2002) o estado do endofítico é regulado por várias etapas nos diferentes níveis fisiológicos, e a interação entre fungo endofítico e planta hospedeira é caracterizada por um delicado equilíbrio entre a virulência do fungo e a defesa da planta. Em associação mutualística os fungos endofíticos produzem as enzimas necessárias para penetrar e colonizar seus hospedeiros extensivamente, sistemicamente, e inter e intracelularmente.

Schulz e Boyle (2005) defendem a hipótese de que não existem interações neutras, mas que as interações endofítico-hospedeiro envolvem um equilíbrio de antagonismos, independentemente do órgão da planta infectada. Há sempre, pelo menos, um grau de virulência por parte do fungo permitindo a infecção, enquanto a defesa da planta limita o acolhimento ligados ao desenvolvimento de doenças pelos fungos invasores. Estes autores propõem que os endofíticos, em contraste com os agentes patogênicos conhecidos, geralmente têm maior plasticidade fenotípica, e assim mais opções que os patógenos. Isso inclui infecção local, mas também extensiva colonização, latência, virulência, patogenicidade e saprofitismo.

Parecem ser raros casos de interações antagonistas causadas pela atividade endofítica por fungos micorrízicos por não-acolhimento nas plantas. Os danos às raízes de plantas não-hospedeiras causada pela tentativa de colonização por fungos micorrízicos arbusculares ou ericóides podem levar a uma redução substancial de crescimento alguns metabólitos fúngicos biologicamente ativos podem inibir a fotossíntese da planta hospedeira (ALLEN, 1989; PLATTNER; HALL, 1995).

Rodriguez et al. (2009), sistematizaram os fungos endofíticos em quatro classes, compostas por endofíticos clavicipitaceus (Classe 1); e endofíticos não-clavicipitaceus que representam três grupos funcionais distintos com base no hospedeiro, colonização, modo de transmissão, em

biodiversidade de plantas e benefícios de *fitness* (Classes 2, 3 e 4). Podemos esperar encontrar em raízes de ericáceas os endofíticos classes 2 (EF) e 4 (DSE).

Os endofíticos Classe 2 (EF) compreendem uma diversidade de espécies (Dikarya), a maioria Ascomycota (Pezizomycotina), e menos frequente Basidiomycota (Agaricomycotina e Pucciniomycotina). Os EF em geral colonizam raízes, caules e folhas, são transmitidos vertical e horizontalmente por meio de cascas de sementes e/ou rizomas, tem baixa abundância na rizosfera, sugerindo que alguns deles são incapazes de competir fora dos hospedeiros enquanto outros podem ter estilos de vida simbióticas ou saprofíticas. Eles têm tipicamente frequências alta de infecção (90 - 100 %) em plantas que crescem em habitats de alta-pressão e conferem benefícios de fitness HA e NHA (RODRIGUEZ et al., 2009).

A primeira descrição detalhada de um endofítico Classe 2 foi *Phoma* sp. em *Calluna vulgaris* (Ericaceae) por Rayner (1915 apud RODRIGUEZ et al., 2009). Embora tenha sido descrito como micorrízico, esse fungo é um endofítico que coloniza todas as partes da planta e não forma estruturas micorrízicas intracelulares. Os endofíticos colonizam plantas através de estruturas de infecção, tais como apressórios ou por penetração direta nos tecidos vegetais através de hifas (ERNST; MENDGEN; WIRSEL, 2003) com crescimento através de tecidos vegetais e intercelular. Em plantas sadias apresenta um baixo nível de esporulação ou formação apressorial (FREEMAN; RODRIGUEZ, 1993; NEWSHAM, 1994). No entanto, Weber et al. (2004) observaram que esses fungos emergem rapidamente e esporulam durante a senescência do simbionte.

Os endofíticos Classe 4, também chamados endofítico septado escuro (DSE), parecem ocorrer de forma onipresente e abundante em vários ecossistemas, sendo prevalente em ambientes de alta-pressão (RODRIGUEZ et al., 2009). Atualmente, a presença de colonização de endofíticos septados e pigmentados em tecido radicular, é o principal critério para a designação DSE. Sendo assim, o termo DSE é usado para indicar similaridade fisiológica e taxonômica, embora uma diversidade de táxon forme hifas pigmentadas endofíticas nas raízes. Por isso, a classificação de fungos como DSE deve ser abordada com alguma precaução, visto que a identificação se baseia em critérios bastante amplos e ambíguos.

Os fungos DSE representam uma classe grande e interessante de endofíticos que não foram bem definidos taxonomicamente e ecologicamente. Um número desconhecido de taxón estão envolvidos, e

pode haver uma considerável sobreposição funcional e ecológica entre fungos do solo, saprófitos do rizoplano, estritamente patogênicos, micorrízicos e endofíticos (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998). No entanto, a base da relação de DSEs com as plantas continua desconhecida, as observações sugerem que os DSE podem desempenhar um papel importante na ecofisiologia das plantas (RODRIGUEZ et al., 2009).

Os endofíticos Classe 4 são principalmente fungos ascomicetos com conídios ou estéreis, que formam estruturas melanizadas, tais como hifas inter e intracelular e microscleródios nas raízes. Embora ainda não esteja estabelecida as conexões entre anamorfos e teleomorfos em DSE, a possibilidade de reprodução sexual deve ser considerada. Devido a presença de DSE em solos e nas raízes das plantas, a transmissão mais provável é horizontal. A fragmentação micelial e a dispersão de conídios parecem ser os meios de transmissão, como demonstrado em condições de laboratório (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998).

DSEs têm pouca especificidade de hospedeiro e habitat, foram relatados em associação com 600 plantas, em diversos ecossistemas, entre eles: antártico, ártico, alpino, subalpino, zonas temperadas, planícies africanas, regiões litorâneas, terras baixas e tropicais (JUMPPONEN; TRAPPE, 1998; JUMPPONEN, 2001). DSEs foram observados em cinco espécies de ericáceas, independentemente do habitat (MASSICOTTE; MELVILLE; PETERSON, 2005a).

Embora DSEs não formem micorrizas ericóides típicas, sua ocorrência frequente em raízes de muitas espécies de ericáceas merece mais estudo (PEROTTO et al., 1996; HAMBLETON; CURRAH, 1997; VRÁLSTAD; FOSSHEIM; SCHUMACHER, 2000), especialmente porque sua função em ambientes naturais não foi bem estabelecida (MASSICOTTE; MELVILLE; PETERSON, 2005a). O fungo DSE *Phialocephala fortinii* foi isolado a partir de raízes de praticamente todas as espécies de ericáceas examinadas nos ecossistemas alpinos, de dunas de areia e áreas de pântano em Alberta no Canadá (HAMBLETON; CURRAH, 1997).

Vohník e Albrechtová (2011) observaram, em *Rhododendron*, associações dos tipos ErM e DSE simultaneamente presentes nas plantas avaliadas; os seus níveis foram negativamente correlacionados; maior colonização ErM ocorreu em locais na Europa meridional e central, enquanto a maior colonização DSE foi encontrado em um local subártico no norte da Finlândia e subalpino, sugerindo uma mudança nas associações de fungos em raízes de Ericaceae em relação a latitude e altitude. Alguns micélios podem formar simultaneamente estruturas

correspondentes a associação ErM e DSE, o que ocasionalmente resultará uma colonização ectendomicorrízica, compreendendo uma rede intercelular parenquimatosa e novelos de hifas intracelulares (VOHNÍK; ALBRECHTOVÁ, 2011).

Quando colonizam raízes, os endofíticos são caracterizados morfológicamente pela presença de hifas simples, intra ou intercelular, alguns formam estruturas semelhantes a dedos, sobre a superfície das células da raiz, outros desenvolvem estruturas especializadas, como microescleródios intracelular com função de armazenamento e de dispersão (JUMPPONEN; MATTSON; TRAPPE, 1998). Segundo Schulz, Boyle e Sieber (2006), ao contrário de fungos micorrízicos, fungos endofíticos não produzem interfaces específicas para o transporte de nutrientes.

No entanto, Usuki e Narisawa (2007) observaram fluxo bidirecional de nutrientes, entre plantas hospedeiras e o DSE *Heteroconium chaetospora*, sugerindo a existência de interfaces fisiologicamente ativas também em associações endofíticas. Baseado em observações morfológicas, uma interface deste tipo pode ser uma rede pseudoparenquimatosa intercelular, que se assemelha a uma rede de Hartig (O'DELL; MASSICOTTE; TRAPPE, 1993; PETERSON; WAGG; PAUTLER, 2008; WURZBURGER; BLEDSOE, 2001). Um estudo mais recente mostrou que os endofíticos são capazes de transferir nitrogênio fósforo e nutrientes não limitantes do solo para as plantas simbioses (BEHIE; BIDOCHKA, 2014).

3.2.2. Estudos sobre diversidade de fungos endofíticos

Análises moleculares realizadas com o objetivo de detectar e identificar fungos das raízes de ericáceas, tanto por método direto, no qual o DNA é extraído diretamente das raízes, quanto por método indireto, dependente de isolamento dos fungos, têm demonstrado que o sistema radicular de uma ericácea pode conter uma população diversa e complexa de fungos (CHAMBERS; LIU; CAIRNEY, 2000; GORZELAK; HAMBLETON; MASSICOTTE, 2012; KJØLLER; OLSRUD; MICHELSEN, 2010; MATSUDA et al., 2012; TIAN et al., 2011). No entanto, para os estudos de associação fungo e planta, tanto método de extração direta de DNA, quanto métodos indiretos, existem possibilidade de vieses, podendo levar a resultados incoerentes.

Sendo assim, alguns pontos devem ser considerados dependendo do método utilizado. Deve-se verificar se categorias de fungos foram

favorecidas, como por exemplo os fungos que crescem facilmente em ágar, ou se o DNA fúngico foi amplificado a partir da rizosfera (SETARO et al., 2006). Na maioria dos casos, a extração do DNA detecta vários fungos diferentes em uma amostra de raiz, mas pode não ser claro quais são os fungos mais abundantes, ou se deixar de detectar os mais importantes nas raízes, e podem excluir espécies raras ou desconhecidas (GORZELAK; HAMBLETON; MASSICOTTE, 2012).

O método direto pode detectar uma diversidade maior, pois abrange os fungos de difícil isolamento e cultivo. Sendo assim, a metagenômica é uma importante ferramenta para estudos ecológicos e detecção de fungos não isolados e cultivados. Estudos com sequenciamento de alto rendimento (HTS) tem revelado amplo espectro de fungos associados a raízes capilares de Ericaceae (ZHANG et al., 2016). No entanto, a pesquisa baseada apenas na extração direta de DNA pode induzir a vieses potenciais inerentes ao processo de sequenciamento (TEDERSOO; LINDAHL, 2016). Em estudo de diversidade de fungos em *Cassiope tetragona* (Ericaceae), no arquipélago de Svalbard no Alto Ártico, Lorberau et al. (2017), usando HTS, encontraram provavelmente um grande viés contra os ascomicetos, que são conhecidos por corresponderem aos principais grupos de fungos ErM, mas que corresponderam apenas a 6% do total. Quando se utiliza apenas o método direto, pode acontecer de polarizar contra alguns táxons, como em Lorberau et al. (2017), que detectaram poucos OTUs de Ascomycota, quando esses eram esperados por serem comuns ErMs. Neste caso ficou a dúvida se estes fungos não estão mesmo presentes, e o método indireto poderia ser conclusivo.

Alguns autores vêm utilizando ambos os métodos, obtendo dados consistentes, Sakakibara et al. (2002) constataram que a identificação microscópica de fungos por morfologia e métodos moleculares (PCR-RFLP) foram concordantes, mas foram obtidos vários fungos a partir de muitos tipos de micorrizas. Outros detectaram dissimilaridade entre os métodos, o que pode ser explicado pelos vieses descritos por Allen et al. (2003). O avanço em estudos de simbiose em Ericaceae tem mostrando que os fungos não estão restritos ao tipo micorrízico ericóide, mas ocorrem frequentemente com outros tipos de fungos (BOUGOURE et al., 2007; SELOSSE et al., 2007). Além disso, a classificação baseada em estrutura morfológica ou função ecológica, na tentativa de distinguir fungos micorrízicos e endofíticos em raízes, pode causar equívocos, uma vez que essa questão é complexa em razão da versatilidade morfológica e funcional e a ocorrência comum desses fungos.

Hambleton e Sigler (2005) verificaram que muitos fungos isolados a partir de ErM e EcM, são agora considerados como constituindo o agregado *Rhizoscyphus ericae*, indicando que ele pode abranger vários táxons. Esse agregado inclui várias outras clades supostamente nomeados como espécies de *Meliniomyces*. Alguns membros do agregado *R. ericae* foram encontrados formando ectomicorrizas (BRUNDRETT, 2004; VRÅLSTAD; SCHUMACHER; TAYLOR, 2002). Fungos que formam EcM, como *Piceirhiza bicolorata*, estão relacionados com fungos que formam ErM (VRÅLSTAD; FOSSHEIM; SCHUMACHER, 2000). Lukesova et al. (2015) comprovaram o potencial de fungos septados escuros (DSEs) do complexo de espécies *Acephala applanata* formar estrutura de simbiose simultaneamente se assemelhando a ErM e DSE em *Vaccinium*. Isolados semelhantes a *Capronia*, frequentemente isolados e considerados como prováveis formadores de ErM, foram obtidos a partir de raízes de *Gaultheria shallon* (ALLEN et al., 2003).

A formação de micorrizas por diferentes grupos de fungos parece ser de ocorrência maior do que se acreditava inicialmente. As vezes os papéis dos fungos são incertos, Allen et al. (2003), verificaram que sequências de DNA de *Sebacina* spp. dominaram raízes de *Gaultheria shallon*, mas não se formaram micorrizas ericóides. A ocorrência de espécies de fungos Sebacinales em associações ericóides têm sido relatadas com frequência, como componentes dominantes de comunidades fúngicas associadas a ErM na América do Norte e nos Neotrópicos (BERCH; ALLEN; BERBEE, 2002; ALLEN et al., 2003; BRUZONE; FONTENLA; VOHNÍK, 2015).

O complexo *Sebacina* inclui uma ampla gama de genótipos estreitamente relacionadas às ErM (ALLEN et al., 2003) e EcM (SELOSSE; BAUER; MOYERSON, 2002). Alguns táxons do grupo Himenomiceto, semelhantes a Sebacinales, formaram ErM em ericáceas (SELOSSE et al., 2007; SETARO et al., 2006). A biodiversidade críptica dos Sebacinales é das maiores dentre os Basidiomycota, e sua atual inacessibilidade é um desafio (OBERWINKLER et al., 2013). Também tem sido encontradas em raízes de ericáceas outros fungos Basidiomycota, Vohník et al. (2012) observaram um basidiomiceto com afinidade com Trechisporales, até então não descrito, formando simbiose ErM morfologicamente distinta.

No Canadá, Berch, Allen e Berbee (2002), usando métodos direto e indireto encontraram as ordens Leotiales, Onyginales, Rhytismatales, Xylariales, Pleosporales e Chaetothyriales, mas concluíram que estes

correspondem a no máximo 10% dos fungos de *Gaultheria shallon*, e que 65% são basidiomicetos que não foram passíveis de cultivo.

Apesar do crescente aumento nos últimos anos no interesse pela simbiose ErM, a diversidade e distribuição global de fungos ErM é ainda mal compreendida (VAN DER HEIJDEN et al., 2015). Segundo Leopold (2016), a amostragem limitada de ErM de muitas regiões em relação à distribuição geográfica de plantas ericáceas atualmente exclui a identificação conclusiva de padrões biogeográficos da composição da comunidade de micobiontes ErM. Isto contrasta fortemente com a diversidade e distribuição global das plantas da família Ericaceae, as suas funções no ecossistema, valor econômico potencial por meio da introdução de inoculações com fungos ErM em esquemas de cultivo comercial (KRON; LUTEYN, 2005; KRON; POWELL; LUTEYN, 2002; VOHNÍK; ALBRECHTOVÁ; VOSÁTKA, 2005).

Em grande parte do Hemisfério Sul e particularmente em pontos de diversidade de Ericaceae existe carência de dados, alguns estudos indicam que pode haver diferença na composição das comunidades de fungos em ericáceas na América do Sul em relação ao Hemisfério Norte (BRUZONE; FONTENLA; VOHNÍK, 2015), ao passo que outros detectam semelhanças (BRUZONE et al., 2017; SETARO; KRON, 2011). Essas diferenças parecem ter relação com a origem das plantas e histórias de vida, Kohout (2017) levanta hipótese de que as comunidades de fungos de ErM na Austrália diferem das de outros continentes, mas destaca que, são necessários muito mais dados, especialmente da América do Sul, África e Ásia, para tirar conclusões mais gerais.

Entre os fungos já sabidamente formadores de associação com ericáceas, métodos de sequenciamento direto podem ajudar a definir padrões biogeográficos e também a diversidade em diferentes escalas (BAHRAM; PEAY; TEDERSOO, 2014). Os membros do agregado *R. ericae*, incluindo *R. ericae* e *M. variabilis*, parecem ser dominantes em muitos habitats boreais, subárticos e da Eurasia temperada (GORZELAK; HAMBLETON; MASSICOTTE, 2012; GRELET et al., 2010; KJØLLER; OLSRUD; MICHELSEN, 2010).

Na Austrália, fungos associados a alguns de gêneros de Ericaceae endêmicos foram investigados, revelando diversas associações de fungos ascomicetos, e espécies relacionadas a *Oidiodendron maius* e *Rhizoscyphus ericae*, grupos de Helotiales, Xylariales, Chaetosphaeriales, entre outros agrupamentos taxonômicos similares aos já identificados como associados a ericáceas em zonas da Austrália e outras partes do mundo (BOUGOURE; CAIRNEY, 2005; CHAMBERS;

LIU; CAIRNEY, 2000; MCLEAN; CUNNINGTON; LAWRIE, 1999; MIDGLEY; CHAMBERS; CAIRNEY, 2004). Na África do Sul, Bizabani (2015) utilizando abordagens direta e indireta, encontrou *Meliniomyces*, *Phialocephala*, *Cadophora*, *Cryptosporiopsis*, *O. maius* e Chaetothyriales.

Na América do Sul, especificamente no Noroeste da Patagônia, a avaliação, por método indireto, de fungos associados a duas espécies de *Gaultheria*, sugeriu que *R. ericae* pode ter baixa abundância ou ser ausente nas raízes de Ericaceae no Hemisfério Sul, enquanto se detectaram Helotiales, Hypocleales, Pleosporales, Mucorales, Mortierellales, Diasportales, as espécies mais frequentes foram *Phialocephala fortinii*, *Pochonia suchlasporia*, *Ilyonectria radícolica*; e na amplificação do DNA das raízes, Sebacinales estiveram presentes em todas as amostras (BRUZONE; FONTENLA; VOHNÍK, 2015). No entanto, em ambiente alpino, com maior altitude em relação ao local anteriormente estudado, e caracterizada pela não ocorrência de árvores, *R. ericae* foi isolado com maior frequência (37%). A maioria dos agrupamentos (OTUs) e isolados pertenciam as ordens aos Helotiales, seguido por Sordariales, Agaricales, Cantharellales, Capnodiales, Pleosporales, Russulares (BRUZONE et al., 2017). Esses resultados sugerem que a distribuição de *R. ericae* é influenciada, entre outros fatores, pela altitude, tipo de solo e e tipo de vegetação.

Outra questão é que com o aumento da capacidade de gerar informações por meio de sequências, os depósitos de MOTUs (*molecular operational taxonomic units*) a partir de amostras ambientais nos bancos de dados vem aumentando. Hibbett et al., (2011), comparando os depósitos de sequências ambientais e baseadas em espécime obtiveram 91.225 sequências, das quais 30.217 (33%) eram de origem ambiental, o agrupamento com uma identidade média de 93% nas sequências ITS1 e ITS2 extraídas gerou 16.969 clusters, incluindo 6.230 (37%) clusters com sequências apenas ambientais e 2.223 (13%) com sequências ambientais e baseadas em espécimes.

Embora tenha aumentado extraordinariamente a capacidade de gerar informações genéticas, se estas não estiverem de alguma forma conectadas as espécies, serão informações com utilidade reduzida, e sujeitas a erros devido a vieses e conhecimento limitado em relação à realidade. Isso não proverá conhecimento sobre as estruturas morfológicas, ciclos de vida, assim como sobre funções ecológicas dos fungos e tantas outras informações.

A integração de dados de ambas as fontes, ambiental e baseadas em espécimes, fornece qualidade e consistência às informações, de modo que a falta de conexão entre estas informações limita a compreensão da diversidade taxonômica e propriedades metabólicas das comunidades de fungos. No entanto, conectar OTUs à nomenclatura binomial clássica, baseada em espécimes, não parece ser uma tarefa tão simples, principalmente devido a diversidade e ao desconhecimento da grande maioria das espécies de fungo, e também em razão dos vieses decorrentes de uso de um *barcoding* universal (BELLEMAIN et al., 2010; SCHOCH et al., 2012; YAHR; SCHOCH; DENTINGER, 2016).

Algumas iniciativas tem focado em conectar o fluxo de dados da sistemática tradicional baseada em espécimes e cultura, e amostras ambientais de metagenômica e estudos metatranscriptômica dentre elas estão SBCI (Sequence-Based Classification and Identification) (HIBBETT et al., 2016), NCBI (National Center for Biotechnology Information) (SCHOCH et al., 2014), e UNITE (Unified system for the DNA based fungal species linked to the classification), sendo este último uma ferramenta que pode ser utilizada para analisar taxonomicamente OTUs de fungos por uma aliança ecológica independente da plataforma de seqüenciamento ou do canal de análise (NGUYEN et al., 2015).

Embora o sequenciamento de alto rendimento permita detectar comunidade de fungos nas raízes e solos, a interpretação dos dados de HTS quanto a presença de fungos nessas matrizes, exige outras perguntas-chave, além de se dever aumentar o grau de replicabilidade e desenvolver estratégias de amostragem padronizadas, que permitam comparações (LINDAHL et al., 2013; TEDERSOO et al., 2015; BÁLINT et al., 2016). Muitas questões talvez possam ser resolvidas de forma eficiente pelo desenvolvimento de abordagens integradas, combinando as técnicas diretas, com extrações de DNA fúngico a partir das plantas, e pelo isolamento e identificação molecular e morfológica de espécimes, bem como por análises das estruturas de associação.

CAPÍTULO 1

BIOLOGIA REPRODUTIVA E VISITANTES FLORAIS DE *Gaylussacia brasiliensis* EM RESTINGA DA ILHA DE SANTA CATARINA

RESUMO

Gaylussacia brasiliensis (Ericaceae) é uma planta nativa do Brasil e amplamente distribuída em diferentes biomas. Geralmente as populações de camarinha estão estabelecidas em ambientes semi-perturbados, com condições adversas de clima e solo. *G. brasiliensis* comumente ocorre na vegetação de Restinga, que possui solo arenoso e influência marítima, associada ao bioma Mata Atlântica. O estabelecimento em ecossistemas diversos está provavelmente relacionado ao valor adaptativo, expresso em plasticidade morfológica nesta espécie. O objetivo deste estudo foi avaliar as estratégias reprodutivas de *G. brasiliensis* nas dunas da Ilha de Santa Catarina. O sucesso reprodutivo foi avaliado pela proporção de sementes com embrião e sem conteúdo (*seed set*), e foi verificada a permanência da viabilidade das sementes no tempo. Também foram analisadas características florais, e realizadas observações de visitantes florais, a partir das informações obtidas são sugeridos polinizadores potenciais. As sementes são ortodoxas e apresentam viabilidade em torno de $34\% \pm 15$ após vários anos de armazenamento. Em Restinga da Ilha de Santa Catarina, a polinização se mostrou primariamente entomófila, sendo os seus principais polinizadores *Aellopos ceculus* (Sphingidae), *Bombus morio* e *Xylocopa brasilianorum* (Apidae). Os resultados de morfologia floral e síndrome de polinização diferem de resultados encontrados no bioma Cerrado. Isto provavelmente indica um fenômeno epigenético, onde a morfologia floral se moldou a disponibilidade de polinizadores. Além disso, *G. brasiliensis* possui *lignotuber*, uma estrutura especializada para armazenagem e reprodução vegetativa em condições severas. Essas características indicam um estilo de vida misto em relação a capacidade de regeneração, comportamento de semeador e rebrotador.

Palavras-chave: *Aellopos ceculus*. Epigenética. *Lignotuber*. Polinização por vibração. Síndrome de polinização.

1.1. INTRODUÇÃO

Gaylussacia brasiliensis Meisn (Ericaceae) ocorre diferentes biomas do Brasil, ao longo de cadeias montanhosas e regiões costeiras, no domínio da Floresta Atlântica de Pernambuco até o Rio Grande do Sul, no Cerrado ao longo da Serra do Espinhaço e na região Centro-Oeste brasileiro, do nível do mar até altitudes de 2.035 m (ROMÃO, 2011). *G. brasiliensis* ocorre em grande parte da costa litorânea em vegetação de Restinga, associada a Floresta Ombrófila Mista do bioma Mata Atlântica.

A camarinha, como é popularmente chamada, é uma planta silvestre, que pertence a tribo Vaccinieae, a mesma dos mirtilos comerciais. Possui uso potencial como alimento funcional e outras aplicações por suas características antioxidantes e nutricionais (BRAMORSKI et al., 2011). *G. brasiliensis* possui também importância ecológica, por suas características de colonização de ambientes severos, podendo ser utilizada para restauração de ambientes degradados e repovoamento em áreas que sofreram ação antrópica.

Estudos para caracterizar o sistema reprodutivo de *G. brasiliensis* podem revelar as estratégias usadas para garantir o sucesso reprodutivo pela capacidade adaptativa. Além disso, tanto para a conservação *in situ* (*circa situ*) quanto *ex situ* é necessário conhecer o comportamento reprodutivo, incluindo as relações desta com polinizadores e características das sementes. As sementes de espécies silvestres carecem de informações sobre comportamento de estocagem, quebra de dormência e outras peculiaridades (HAY; PROBERT, 2013).

Muitas espécies de ericáceas precisam receber visitas de animais para a polinização efetiva, os visitantes produzem vibração nas anteras para liberar pequenas cargas de pólen das anteras poricidas e são hercogâmicas. A necessidade de sonicação por algum visitante floral age como um mecanismo eficaz de distribuição de pólen, restringindo a remoção por polinizadores e liberação de acordo com a taxa de visitação (BUCHMANN; HURLEY, 1978; CANE; PAYNE, 1988). As anteras tubulares protegem os grãos de pólen de riscos ambientais (BUCHMANN; HURLEY, 1978) e os poros amplos garantem uma descarga considerável de pólen.

Segundo Gentry (1982), na evolução da tribo Vaccinieae, processo de especiação que aconteceu com colonização das regiões temperadas para tropicais, a síndrome de polinização acompanhou a uma mudança de insetos para beija-flores. Algumas ericáceas neotropicais são ornitófilas, enquanto outras são melitófilas, (ARAÚJO; FARIAS;

OLIVEIRA, 2011; FREITAS; GALETTO; SAZIMA, 2006; MOREIRA; MIRANDA; LIMA, 2017), apesar das características florais nem sempre serem marcadamente especializadas (NAVARRO; GUITIÁN; AYENSA, 2008). A polinização de Ericaceae nas latitudes temperadas e subtropicais é principalmente entomófila (LUTEYN, 2002).

No Cerrado, *G. brasiliensis* foi observada sendo polinizada por beija-flores, e os insetos visitantes foram considerados pilhadores dos recursos florais. Nos testes de polinização a campo, polinização cruzada e autopolinização, observaram desenvolvimento de tubo polínico, utilizando como indicativo de sucesso reprodutivo a formação de frutos (*fruit set*). Concluíram que a espécie não apresenta autoincompatibilidade, mas não apresentou autopolinização espontânea e nem apomixia, necessitando da ação dos visitantes florais (ARAÚJO; FARIAS; OLIVEIRA, 2011).

Em habitats com algum nível de perturbação, ocorre certa variação na interação entre plantas e polinizadores. Sendo assim, ocorre tendência a imprevisibilidade da quantidade e do espectro de visitantes florais de determinada espécie de planta (KEARNS; INOUE; WASER, 1998). Quando uma planta é visitada por vários grupos funcionais, as pressões seletivas relativas que exercem são susceptíveis de diferir muito, sendo que as características florais das espécies de plantas que habitam áreas semidisturbadas, podem mostrar sistemas de polinização mista (FENSTER et al., 2004).

A forma da corola tubular a urceolada, escondendo o néctar, é uma forma paralela de redução do leque de potenciais coletores de néctar, para aqueles que possuem aparelho bucal longo (KNUDSEN; OLESEN, 1993). No entanto, as flores tubulares das ericáceas, estão sujeitas a roubo de néctar, e os pilhadores de recursos florais podem ter influência sobre o valor adaptativo da planta. Eles desempenham um papel importante ao gerar modificações e evolução nos traços florais, moldando a estrutura da população e influenciando a dinâmica da comunidade (ROJAS-NOSSA; SÁNCHEZ; NAVARRO, 2016).

Segundo Navarro (1999), o roubo do néctar significa um alto custo energético para a planta, pois precisa repor o conteúdo removido pelos pilhadores, e isso ainda resulta em menos néctar disponível aos polinizadores efetivos. No entanto, o resultado pode ser um aumento no *fitness* da planta, se os polinizadores respondem à diminuição de recursos buscando outras flores mais distantes e se movimentando mais entre plantas.

Na espécie *Disterigma stereophyllum*, a corola é curta, branca e urceolada, características típicas de plantas melitófilas, mas a composição e a quantidade de néctar são similares as observadas em espécies polinizadas por beija-flores, por flor em 24 horas foi $48 \pm 49 \mu\text{l}$, e concentração de açúcar foi $21.2 \pm 6.6\%$ (NAVARRO; AYENSA; GUITIÁN, 2007).

Existem pouca pesquisa sobre *G. brasiliensis*, a biologia reprodutiva foi caracterizada, quanto a morfologia floral e visitas florais, no Cerrado, na vegetação de Mata de Galeria em Minas Gerais (ARAÚJO; FARIAS; OLIVEIRA, 2011).

Espécies do gênero *Gaylussacia* possuem ovário decalocular, os lóculos são uniovulados e o fruto tipo nuculânio, sendo estas características sinapomorfias indicadoras de que provavelmente este gênero é monofilético (ROMÃO, 2011). Sendo assim, neste gênero os frutos possuem sementes em número de dez (MARQUE; KLEIN, 1975). Em *G. brasiliensis*, independentemente de ter ocorrido polinização, os frutos possuem dez sementes. Se os óvulos não foram fecundados, as sementes ficam vazias. Sendo assim, um parâmetro adequado para avaliação do sucesso reprodutivo nessas ericáceas é *seed set*, em detrimento a *fruit set*.

A falta de conhecimento sobre a quebra de dormência e requisitos para a germinação dificulta testes de germinação. Em espécies de plantas silvestre é esse os períodos de incubação podem se prolongar até muitas semanas ou meses, ocasionando perdas de sementes que não pela não viabilidade. Uma maneira de contornar esse problema é realizar teste de tetrazólio, em que os tecidos de sementes viáveis se tornam coloridos um vermelho, indicando a viabilidade ((HAY; PROBERT, 2013). Em Ericaceae são frequentemente observadas sementes ortodoxas (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1985). O comportamento ortodoxo é indicado pela longevidade das sementes, uma vez que, o período de estocagem é inversamente proporcional a umidade da semente (CHIN; KRISHNAPILLAY, 1989).

Este estudo se desenvolveu com os seguintes objetivos: (1) estudar características reprodutivas, a relação funcional entre morfologia floral, visitas legítimas, ilegítimas e roubo de néctar; e (2) avaliar o potencial reprodutivo em Restinga; (3) caracterizar a estrutura especializada que responsável pela propagação vegetativa. Foi ainda realizada uma análise comparativa entre características florais e visitantes em outro bioma.

Para isso foram realizadas observações de visitantes florais, e coletas de campo de flores e sementes. Os insetos, visitantes florais, foram avaliados quanto ao comportamento e presença de pólen. Para a avaliação do sucesso reprodutivo foi aplicado como indicador a formação de sementes com embrião e viáveis (*seed set*). Em amostragens ao longo de um período de doze anos, foi avaliada a viabilidade dessas sementes, revelando que as sementes são ortodoxas, capazes de manter a viabilidade por mais de uma década.

Foram encontradas diferenças na morfologia floral e na síndrome de polinização entre as plantas da vegetação de Restinga (Floresta Ombrófila Densa), das flores observadas no Cerrado. Indicando que a pressão de polinização pode estar desencadeando um fenômeno epigenético.

Foi ainda realizada a caracterização do *lignotuber*, estrutura com a qual a planta se reproduz vegetativamente. Esta estrutura especializada a torna eficiente para se propagar e garantir que os rebentos atinjam a fase de reprodução sexual. E para suportar condições e eventos severos, como seca, alagamento, fogo e rebrotar para regeneração.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, na Ilha de Santa Catarina, formado por dunas de areia e vegetação de Restinga. O parque está entre 0 e 30 m de altitude e entre as coordenadas 27°37'46"S, 48°27'52"W e 27°36'37"S, 48°27'15"W.

O clima é mesotérmico úmido, segundo a classificação de Köppen-Geiger (KOTTEK et al., 2006), a média da temperatura anual é de 21°C, a umidade relativa média anual do ar é de 82% e o índice pluviométrico em torno de 1.600 mm.

O estudo foi conduzido de campo de novembro de 2014 a janeiro de 2017, no entanto parte das sementes já estavam armazenada no laboratório desde o ano 2005. Foram registrados os dias, horários de observação, coleta e outras atividades, assim como as condições climáticas (Apêndice A). Foi solicitada autorização para a realização de atividades científicas (SISBIO 46847-2; Prefeitura de Florianópolis E068045/2014).

Todas as imagens de microscopia confocal a laser (MCL) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC).

1.2.1. Análise de sementes

O sucesso da polinização foi avaliado por meio da taxa de sementes viáveis. O número de sementes em *G. brasiliensis* é praticamente fixo e a planta parece ser capaz de formar frutos mesmo sem que ocorra a polinização. Sendo assim, a formação de sementes com embrião e endosperma foi aplicado como indicativo de polinização.

Foram analisadas sementes coletadas, de pelo menos 30 plantas por amostragem em diferentes anos: 2005 (março), 2006 (maio e dezembro), 2009 (fevereiro, abril, junho e novembro), 2014 (dezembro), 2015 (janeiro e maio) e 2016 (janeiro, fevereiro, março e junho). Foram coletados frutos maduros, que logo foram despolidos, as sementes separadas da polpa, lavadas e secas a 40 °C por 24 h. As sementes coletadas entre os anos 2005 a 2009, estavam armazenadas (possivelmente a maior parte do tempo) a 4 °C por diferentes períodos no refrigerador do laboratório, foram coletadas durante um experimento anterior (SANTOS; HEBERLE; LOVATO, 2013). Em janeiro de 2016, as sementes foram avaliadas (n=26.521), separadas entre cheias (com embrião e endosperma) e vazias (sem conteúdo). A separação ocorreu por depositando as sementes em um béquer de 250 mL, contendo 100 mL de água, as sementes com conteúdo afundavam, enquanto que as vazias permaneciam na superfície.

A viabilidade das sementes com endosperma e embrião foi avaliada pelo teste de tetrazólio (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1985a), realizando as adaptações necessárias para as especificidades das sementes de Ericaceae (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1985b). Este teste é frequentemente utilizado avaliação de sementes de plantas silvestres, pequenas e com dormência, fatores que impedem os testes tradicionais de germinação. As sementes, embebidas em água por 48 h, foram cortadas longitudinalmente através de quase todo o embrião, desde o centro da parte curva posterior, até os extremos da radícula e dos cotilédones. As sementes foram mantidas em solução de tetrazólio a 0,075% por 24 horas a 30 °C, e avaliadas quanto aos danos no embrião e endosperma, e então verificada a viabilidade, observando a coloração do embrião e endosperma. A relação entre sementes com embrião e sementes vazias (*seed set*) foi quantificada.

Para análise estatística os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, a seguir foi aplicado análise de variância ANOVA (Análise de variância).

1.2.2. Características de recursos florais – néctar e pólen

A morfologia floral foi avaliada em 30 plantas, tomando as medidas do comprimento do tubo da corola, do diâmetro da abertura principal da corola, comprimento do pistilo, e comprimento do estame. Em outras dez flores foram registrados o número de óvulos e estames por flor.

Para a avaliação do néctar potencial, foram ensacados cachos florais de 30 plantas, que possuíam flores em fim de pré-antese, após aproximadamente 24 horas foram determinados o volume e a concentração de açúcar do néctar das flores que haviam entrado em antese ($n = 81$), no período entre as 8:00 e 11:00h. Para isto, o néctar foi coletado com tubos micro capilares de vidro com capacidade de $5 \mu\text{L}$ (DAFNI, 1992).

A concentração de açúcar no néctar foi medida em flores cujo volume atingiu uma quantidade mínima que viabilizasse a avaliação com refratômetro portátil (Bellingham & Stanley, Eclipse). O néctar instantâneo foi avaliado em dois horários distintos, entre 8:00 e 9:00h e entre 17:00 e 18:00h, coletando-se o néctar de flores abertas ($n = 76$). E em avaliação de hora em hora, sendo coletado às 6, 7, 8 e 9:00h ($n = 128$).

Para realizar o teste de receptividade do estigma foi avaliada uma flor por planta, de 12 flores por classe fase fenológica, classificadas em flor balão, pré-antese, antese e corola senescente. Foi utilizada a técnica que relaciona a atividade da enzima peroxidase no estigma com o aumento da adesão e germinação dos grãos de pólen (GALEN; PLOWRIGHT, 1987). Para isso foi utilizado peróxido de hidrogênio (H_2O_2 10 volumes) para detectar a ação da enzima peroxidase, cuja presença foi indicada pela formação de pequenas bolhas nos estigmas receptivos.

Estimou-se o número de grãos de pólen (tétrades) produzido por flor por meio da diluição, em micro tubos com $0,5 \text{ mL}$ de água destilada, de 4 anteras em tubos micro tubos com $0,5 \text{ mL}$ de água destilada, de quatro flores ensacadas na pré-antese em cinco indivíduos, totalizando 20 flores. Realizou-se a contagem do número de tétrades por flor em quatro amostras de $1,5 \mu\text{L}$ de cada micro tubo, separadas em lâminas reticuladas e observadas sob microscópio óptico com objetiva de 40 vezes (KEARNS; INOUE, 1993). Seguindo a técnica de Petri (1976), calculou-se o número de tétrades por antera, a partir da fórmula $N = X \times 500 / 1,5 \times 1/4$, onde 'N' é o número de grãos de pólen por antera; 'X' é o número médio de grãos de pólen das 4 amostras; 500 é o volume de água

em mm^3 ($1 \text{ mL} = 1 \text{ mm}^3$); 1,5 é o volume (μL) de solução transferida para a lâmina; 4 é o número de anteras por suspensão.

Determinou-se o número de óvulos através do corte da parede do ovário de 20 flores de cinco plantas distintas, seguindo a contagem dos mesmos sob estereomicroscópio com 16 vezes.

A viabilidade das tétrades foi avaliada pela germinação do pólen *in vitro*. Pólen fresco, obtido de anteras que foram mantidas em temperatura ambiente por 24 horas para liberação das tétrades. Estas foram postas para germinar em meio de cultura preparado com 1 g de ágar em 100 mL de água destilada, com diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40) e ácido bórico (0 e 40 mg/L).

O meio foi aquecido para dissolver completamente o ágar sem chegar a ebulição, e ainda quente foi dispensado 10 mL por placa de Petri. O pólen foi aspergido levemente sobre a superfície do meio de cultura, com auxílio de um pincel fino. As placas foram observadas nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6 e 18 horas. Para avaliação da germinação do pólen, foi considerando germinado cujo comprimento do tubo polínico tivesse ultrapassado o diâmetro do grão de pólen (KEARNS; INOUE, 1993).

1.2.3. Visitantes florais

As sessões de observação ocorreram entre os meses de novembro de 2014 e maio de 2015, totalizando 28 horas de observação.

Foram acompanhados e anotados diretamente no campo a presença, frequência de visitas e o comportamento dos visitantes florais conforme método adaptado (ARAÚJO; FARIAS; OLIVEIRA, 2011; LENZI; MATOS; ORTH, 2006). Em algumas das sessões de observação foram realizadas também coletas de insetos com redes entomológicas, os quais foram foto documentados, armazenados em álcool 70%, dissecados em algumas ocasiões, e posteriormente identificados. Dados de temperatura e umidade relativa foram coletados *in loco* utilizando higrômetro digital SH 122. Foram registradas medidas de temperatura e estimativa da velocidade do vento durante as coletas, utilizando termohigrômetro e a escala de Beaufort (LAROCA, 1995).

A análise do comportamento dos visitantes florais foi realizada por meio da observação do tempo de permanência de cada visitante, se o ato do inseto pousar na planta produzia vibração e se tocava o estigma, classificando-os como possíveis polinizadores efetivos, ocasionais ou pilhadores. O comportamento foi analisado com o auxílio de registros fotográficos e vídeos digitais.

Quando capturados, os insetos foram medidos (envergadura das asas, aparelho bucal, tórax, abdômen), foi verificada a presença de pólen aderido ao corpo, utilizando estereomicroscópio binocular e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para MEV, os espécimes foram desidratados por 72 horas a 40 °C em estufa, e então foram submetidos a metalização com ouro (AZEVEDO FILHO et al., 2008). Quando necessário os insetos observados tiveram as partes extraídas para uma melhor observação.

1.2.4. Análises anatômicas por microscopia

Para análise das partes florais, estigma e estilete, foi utilizada MEV e MCL. Para MEV, o material biológico foi desidratado em série etílica gradual a cada 10% até 100%, por 30 min em cada graduação. Após a desidratação, as amostras foram secas em equipamento de ponto crítico Leica EM CPD300. Foram então aderidas sobre suportes de alumínio com fita de carbono dupla face, e cobertas com 20 nm de ouro, em metalizador Leica SCD 500. As partes florais foram analisadas e documentadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM-6390LV.

Para microscopia confocal a laser (MCL) do pólen e estigma, o material fresco foi submerso em fucsina ácida 0,05% em ácido láctico 85%, colocado em lâminas com água. Para MCL foi utilizado Microscópio Leica DMI6000 B. A faixa de fluorescência excitação/emissão utilizada foi excitação 543 nm (verde) e filtro de emissão na faixa de 600-739 nm (vermelho). O programa Lite LAS-AF (Leica) foi usado para o processamento final das imagens confocais.

1.2.5. Análise da estrutura subterrânea

Para caracterização da estrutura de propagação vegetativa, foi coletado a campo um fragmento de aproximadamente 10 cm, logo abaixo da planta mãe. A análise morfológica e anatômica do lignotuber realizadas com microscopia de varredura e microscopia óptica, foram seccionados transversal e longitudinalmente em pedaços de aproximadamente 3 mm. Este material foi preparado para MEV de forma semelhante ao processo já descrito no item anterior. Passou por desidratação alcoólica e cobertura de ouro em Leica SCD 500, e foi observado em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM-6390 LV.

Também foi feita secção transversal com lâmina manual, o mais fina possível, para visualização em microscópio óptico Olympus BX40.

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Análise de sementes

As sementes de *Gaylussacia brasiliensis* (Meisn.) de todo o período avaliado, oito em um período de doze anos, apresentaram uma viabilidade de $34 \pm 15\%$. A percentagem média de sementes com conteúdo, embrião e endosperma, foi de $44 \pm 12\%$ sendo que, $76 \pm 25\%$ estavam viáveis (Fig. 6A-6D, 6G), e o restante embora tivesse conteúdo não estava viável (6E, 6F, 6H, 6I).

Os dados de viabilidade se mostraram paramétricos, sendo que a relação das sementes com embriões viáveis, indicou que os fatores estação do ano ($p = 0,610$) e ano de coleta ($p = 0,833$), não interferem na presença de embrião. Da mesma forma, estação do ano ($p = 0,186$) e o ano ($p = 0,448$) não interferiram na viabilidade das sementes. Foram observadas sementes viáveis em todos os períodos de armazenamento avaliados (Fig. 5).

Figura 5 - Análise de viabilidade e longevidade de sementes de *Gaylussacia brasiliensis*. Percentagem de sementes cheias (com embrião e endosperma); de sementes vazias (sem embrião e endosperma); e viabilidade total (sementes cheias com potencial de germinação, analisado com o teste tetrazólio). Sementes coletadas nos anos 2005, 2006, 2007, 2009, 2014, 2015 e 2016, e armazenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por períodos 11, 10, 9, 8, 2 anos e menos de 1 ano.

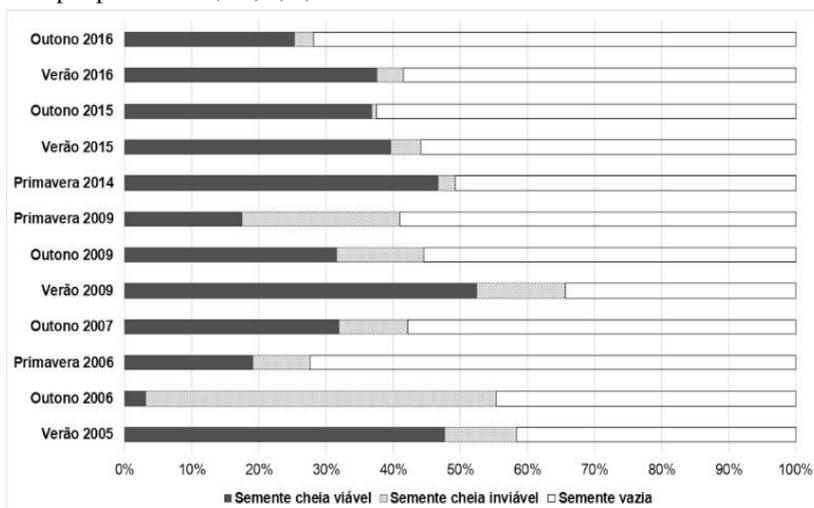
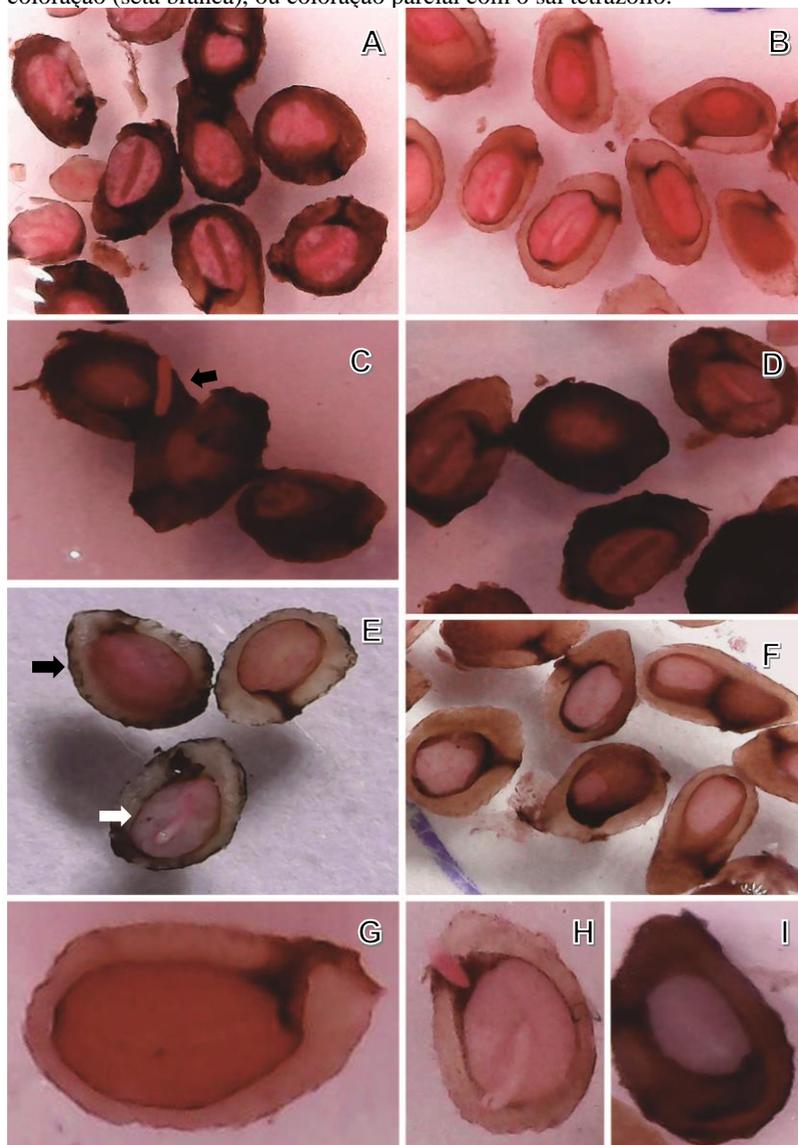


Figura 6 - Sementes de *Gaylussacia brasiliensis*, cortadas longitudinalmente expondo o endosperma e embrião, submetidas a teste de tetrazólio. (A-D e G) Sementes viáveis, mostrando tons avermelhados da redução oxidativa do tetrazólio que ocorre em tecidos vivos (setas pretas). (E) Semente viável e (F, H, I) sementes não viáveis nas quais existe indicação de tecido danificado, pela não coloração (seta branca), ou coloração parcial com o sal tetrazólio.



1.3.2. Características e recursos florais

As flores possuem corola urceolada com estreita abertura apical de $2,0 \pm 0,01$ mm, mostrando hercogamia (Fig. 9A, 9B), comprimento do pistilo $9,0 \pm 0,10$ mm e estame $8,0 \pm 0,10$ mm, com baixo desvio padrão (Tab. 1). A pilhagem de recursos florais não foi quantificada, mas foi observada com muita frequência (Fig. 9D, 9E, 9F).

Tabela 1- Morfologia floral de *Gaylussacia brasiliensis*, comprimento e abertura da corola, do pistilo, do estame, número de anteras, de óvulos e pólen por flor.

	Comprimento mm	Abertura mm	Pistilo mm	Óvulos unidade	Estame mm	Anteras unidade	Pólen unidade
Média	10,0	2,0	9,0	10,0	8,0	10,0	11.215
DP	$\pm 0,1$	$\pm 0,01$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,3$	-

Foi observada protandria, o estigma estava receptivo em todas as fases fenológicas analisadas: balão, pré-antese, antese e corola senescente. Isto indica protandria. Não foi avaliada a maturidade do pólen para indicar uma possível protogenia.

As flores de *G. brasiliensis* apresentaram em média 11.215 tétrades e dez óvulos por flor (Fig. 9C), ou seja, a razão pólen: óvulo encontrada foi de 1.121.

O volume de néctar potencial, acumulado em 24 horas por flor, e a concentração de açúcar foram respectivamente $1,70 \pm 0,90$ μ L e $22,14 \pm 5,44\%$. No mesmo momento, às 8:00 h, o volume e concentração do néctar instantâneo foram $1,00 \pm 0,96$ μ L e $18,51 \pm 6,12\%$; e no fim da tarde o volume foi $0,12 \pm 0,16$ μ L (Fig. 7A). Os dados de volume de néctar potencial e instantâneo as 8:00h (Fig. 7A) não são paramétricos e foram submetidos ao teste Mann-Whitney que indicou diferença significativa ($\alpha = 0,5$) entre eles ($p < 0,001$). Já os dados de concentração de açúcar são paramétricos, foi aplicado o teste T, não apontando diferença significativa, entre concentração de açúcar no néctar potencial e no instantâneo ($p < 0,05$).

O néctar instantâneo coletado de hora em hora entre as 6:00 e 9:00h apresentou respectivamente os volumes de $1,35 \pm 1,89$ μ L; $1,48 \pm 1,47$ μ L; $1,57 \pm 1,80$ μ L; e $1,17 \pm 1,66$ μ L (Fig. 7B).

O néctar é produzido em tecido subepidérmico, liberado através de estômatos modificados (Fig. 8H), e armazenado na câmara nectarífera (Fig. 8G), localizada topo dos ovários, no fundo da corola. O volume máximo de néctar coletado foi 6,25 μ L, indicando possivelmente a capacidade aproximada de armazenamento.

Figura 7 - Caracterização de néctar de *Gaylussacia brasiliensis* em Florianópolis. (A) Volume ($\mu\text{L}/\text{flor}$) de néctar potencial e concentração de açúcar (%) por flor (em 24 horas); e néctar instantâneo às 8:00 e 17:00h em dezembro de 2014; (B) volume de néctar e instantâneo ($\mu\text{L}/\text{flor}$), e concentração de açúcar no néctar instantâneo (%) em coleta horária 6:00, 7:00, 8:00 e 9:00h em janeiro de 2016.

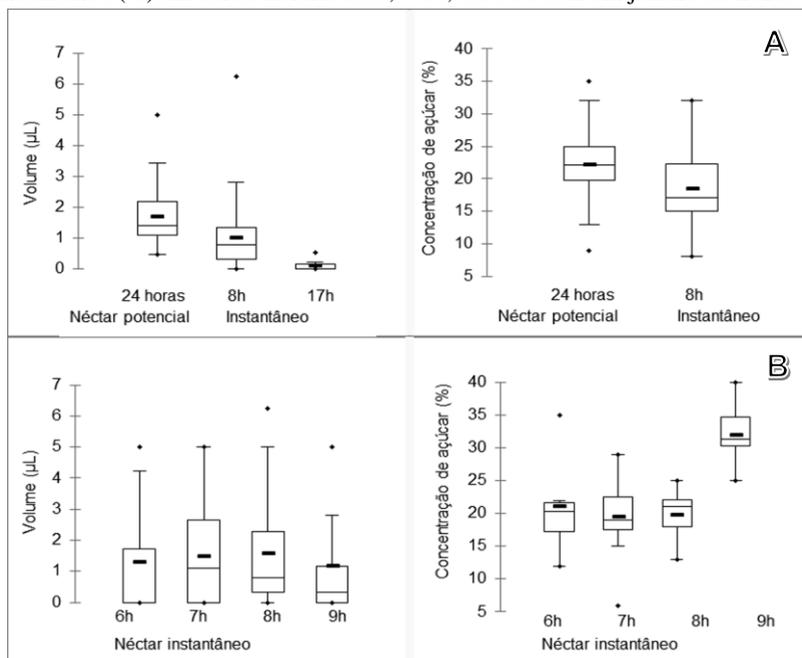
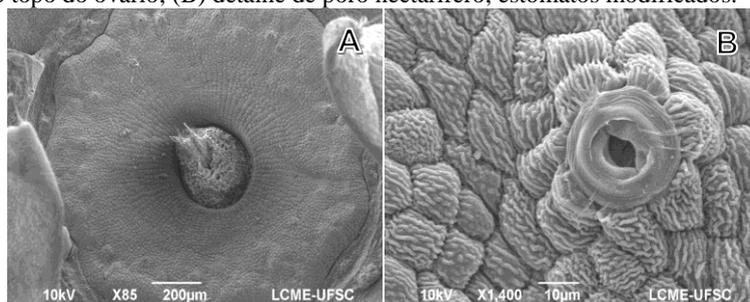


Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando (A) disco nectarífero no topo do ovário; (B) detalhe de poro nectarífero, estômatos modificados.



O pólen é do tipo tétrade, com aproximadamente 40 μm , liberado através de anteras poricidas em pequenas descargas (Fig. 10A-10D).

Figura 9 - Morfologia floral de *Gaylussacia brasiliensis*. (A) Flor exibindo abertura da corola e hercogamia, estigma com pólen aderido; (B) flor após a visita por beija-flor, abertura da corola com danos. (C) ovários decalocular; (D) corola danificada por *Trigona spineps*; (E, F) inflorescências danificadas por pilhadores.

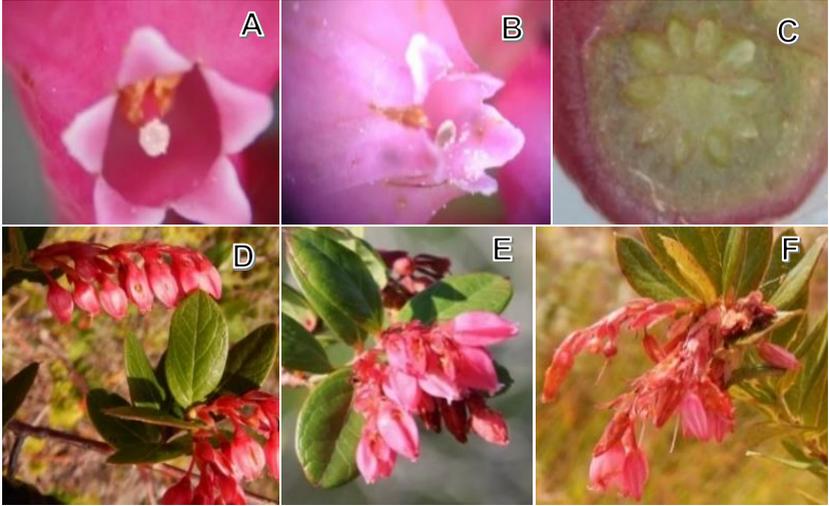
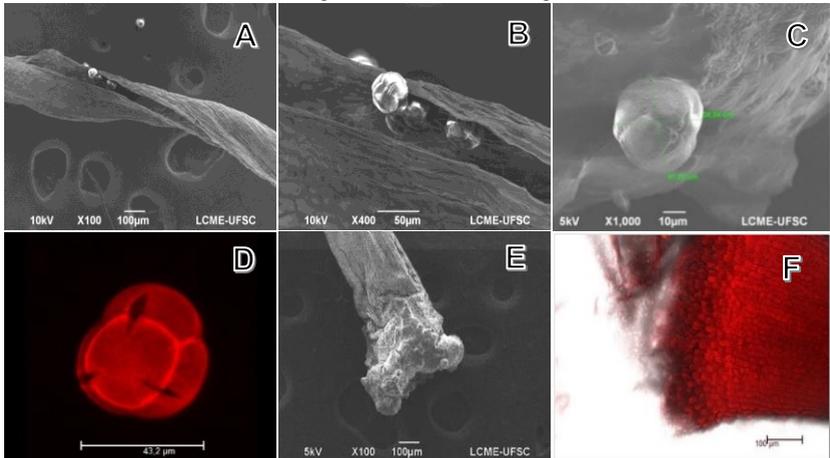
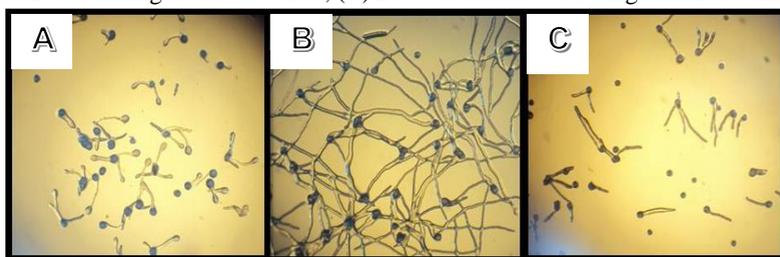


Figura 10 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal a laser (MCL) mostrando detalhes das estruturas masculina e feminina das flores de *Gaylussacia brasiliensis*: (A) antera poricida com poro amplo; (B) detalhe de grãos de pólen sendo liberados pelo poro; (C) caracterização de tétrade com aproximadamente 40 μm de diâmetro; (D) pólen em MCL, corado com fucsina ácida; (E) MEV do estigma; (F) MCL do estigma.



A germinação *in vitro* dos grãos de pólen fresco diferiu quanto à concentração de sacarose no meio de cultura e ocorreu emissão de tubos polínicos a partir da primeira hora de observação. O meio considerado ideal foi aquele contendo 10 % de sacarose e 40 mg de ácido bórico, apresentando germinação superior a 95 % (Fig. 11B). Não foi observada germinação de tétrades nos meios contendo 30 e 40 % de sacarose. Nos meios com 0 % de sacarose e 0 mg de ácido bórico foi aproximadamente 70 % (Fig. 11A) e 20 % de sacarose e 40 mg de ácido bórico a germinação observada foi 60 % (Fig. 11C).

Figura 11 - Germinação *in vitro* de pólen de *Gaylussacia brasiliensis* seis horas após a sementeira. (A) meio 0 % de sacarose e 0 mg de ácido bórico; (B) 10 % de sacarose e 40 mg de ácido bórico; (C) 20 % de sacarose e 40 mg de ácido bórico.



1.3.3. Visitantes florais

Os principais visitantes florais observados foram das ordens Hymenoptera e Lepidoptera (Tab. 2). Algumas espécies são listadas como potenciais polinizadoras, pois são capazes de produzir sonicação ao tocar o estigma, e foi observado pólen em alguma parte do corpo (Tab. 3).

Os visitantes observados mais frequentemente foram as abelhas grandes, *Xylocopa brasilianorum* (Linneus) e *Bombus morio* (Swederus) e a mariposa beija-flor *Aellopos ceculos* (Cramer), ambas produzem sonicação. No entanto as abelhas grandes exibiram comportamento variado, alcançando o néctar pela abertura da corola (Fig. 12A), tocando o estigma com partes do corpo (Fig. 12B), perfurando a corola para chegar ao néctar (Fig. 12C) ou aproveitando aberturas já existentes feitas por pilhadores. Pólen de camarinha e de outras espécies foram observados em partes do corpo desses insetos (Fig. 12D, 15A-15H), portanto, as visitas das abelhas grandes podem ser legítimas ou pilhagem (Tab. 2).

Algumas espécies da ordem Lepidoptera foram observadas visitando as flores (Fig. 13A), geralmente buscando o néctar pela abertura da corola, mas a maioria não parece capaz de produzir vibração nas flores.

Tabela 2 - Comportamento e frequência de visitantes florais *Gaylussacia brasiliensis* em Restinga de Florianópolis, SC, por período de 28 horas de observação. Pilhagem = Pi; Polinização = Po.

Ordem	Visitante	Visita	Recurso	Entre plantas	Toca estigma	Produce vibração	Ação
Hymenoptera	<i>Apis mellifera</i>	3	Néctar e pólen	Sempre	Ocasional	Não	Pi
	<i>Odontomachus</i> spp.	-	Néctar e Pólen	Sempre	Sim	Não	Po, Pi
	<i>Trigona spineps</i>	15	Néctar	Frequente	Não	Não	Po, Pi
	Abelhas grandes ¹	35	Néctar e Pólen	Sempre	Ocasional	Sim	Po, Pi
Lepidoptera		3		Frequente	Não	Não	Pi
	<i>Aellopos ceculus</i>	9	Néctar	Sempre	Sim	Sim	Po
	Lepidoptera spp ²	8	Néctar	Frequente	Sim	Não	
Apodiforme							
Trochilidae	<i>Amazilia fimbriata</i>	1	Néctar	?	Sim	Sim	Po

¹*Bombus morio* e *Xylocopa brasilianorum*

Figura 12 - Comportamento variado de *Xylocopa brasilianorum* (A, C) e *Bombus morio* (B, D) visitando *Gaylussacia brasiliensis*. (A) *X. brasilianorum* produzindo sonicação; (B) *B. morio* coletando néctar pela abertura da corola; (C) *X. brasilianorum* perfurando a base da corola para roubar néctar; (D) *B. morio* com pólen espalhado por todo o corpo, com aglomerados no abdômen e aparelho bucal (setas laranjas).



Foram observadas *Trigona spinipes* (Fabricius) (Fig. 13C), *Apis mellifera* (Linnaeus) e diferentes espécies de formigas (Fig.13D). Estas

abelhas têm comportamento variado, raramente tocam o estigma. Geralmente aproveitam de aberturas feitas por outros pilhadores, mas algumas vezes podem tentar alcançar néctar e pólen pela abertura da corola (Fig. 13B). Foram encontrados poucos grãos de pólen nas amostras de *A. mellifera* analisadas (Fig. 16).

Tabela 3 - Espécies de insetos potenciais polinizadores coletados em *Gaylussacia brasiliensis*, comprimento das partes do inseto, tórax, abdômen, comprimento do aparelho bucal medido a partir do labro, comprimento total, envergadura da asa (Enver.), localização de pólen e relação possível.

Espécies	Ap. bucal mm	Tórax mm	Abdômen mm	Total mm	Enver. mm	Localização do pólen	Relação possível
Hymenoptera							
Apididae							
<i>Xylocopa brasilianorum</i>	9,7 (\pm 0,8)	8,0	15,0	30,2 (\pm 2,2)	52,6 (\pm 2,8)	Patas, tórax e abdômen.	Pol/ pil
<i>Bombus morio</i>	9,5 (\pm 1,3)	11,0	16,0	26,8 (\pm 5,3)	40,0 (\pm 1,2)	Cabeça, patas e abdômen.	Pol/ pil
Lepidoptera							
Sphingidae							
<i>Aellopos ceculus</i>	17,0 (?)	9,0	15,0	24,0	49,0	Probóscide	Pol

Figura 13 - Visitantes florais de *Gaylussacia brasiliensis* que não produzem sonicação. (A) Espécie de Lepidoptera, coletando néctar pela abertura da corola; (B) *Apis mellifera*, coletando pela abertura da corola; (C) *Trigona spinipes*, pilhando; (D) Formigas (*Odontomachus* spp.) pilhando recursos florais.



A mariposa beija-flor, *Aellopos ceculus* Cramer (1777), possui hábitos diurnos, foi observada no período da manhã e no fim da tarde entre 16:00 e 18:00h, quando foram coletados dois espécimes (Figs. 14C, 14D). Esta mariposa coleta néctar pairando em torno das flores e toca o estigma com a probóscide. Nesta estrutura foi observada carga pura de pólen de *G. brasiliensis* (Figs. 14A, 14B), não se observou pólen em outras partes do corpo (Figs. 14E, 14F), pilhagem de néctar, danos a corola, nem desperdício de recursos florais, diferentemente dos outros visitantes florais observados nas flores de camarinha.

Figura 14 - Espécie de Lepidoptera, Sphingidae, mariposa *Aellopos ceculus*, espécimes coletados na Restinga em 11/02/2015, visitando flores de *Gaylussacia brasiliensis*. (A, B) pólen concentrado na probóscide; (C, D) indivíduos com possível dimorfismo sexual macho e fêmea respectivamente; (E, F) microscopia de varredura, mostrando a ausência de pólen em outras partes do corpo.

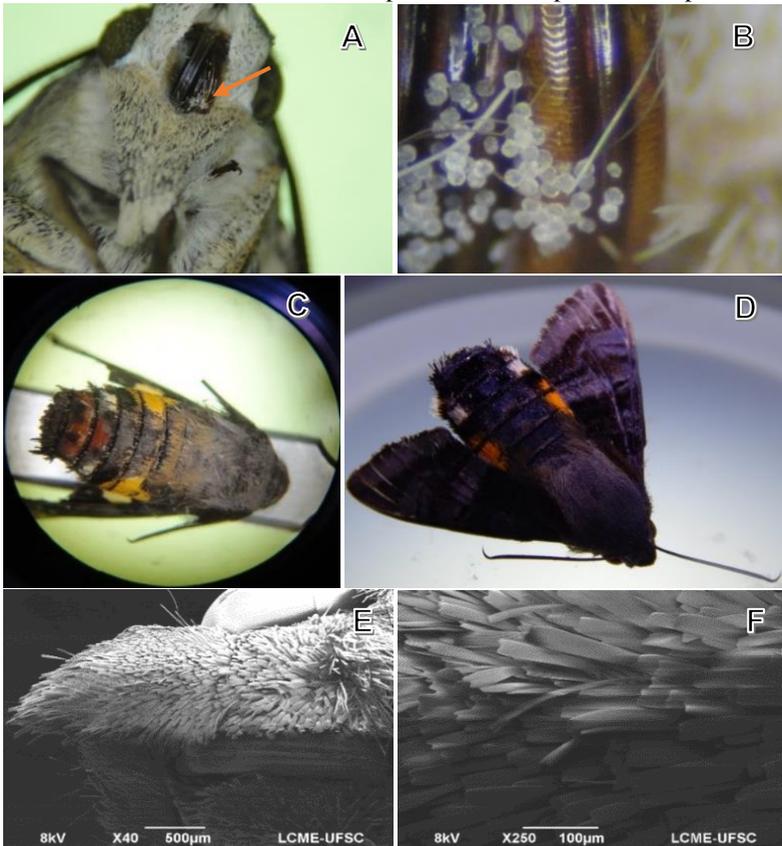


Figura 15 - Imagens de microscopia de varredura em insetos capturados visitando flores de *Gaylussacia brasiliensis*, mostrando pólen da camarinha (setas brancas), *Xylocopa brasilianorum* (A-D) e de *Bombus morio* (E-H). (A) Cabeça de *X. brasilianorum* com aglomerados de pólen; (B) detalhe da mandíbula contendo pólen de camarinha e outras espécies de plantas; (C) pólen de camarinha e outras espécies no abdômen ventral; (D) pata posterior com pólen de diversas espécies de plantas; (E) Cabeça de *B. morio* apresentando alta concentração de pólen de diversas espécies; (F) curvícula com pólen de diversas espécies; (G) pata com pouco pólen; (H) tórax com pólen de diversas espécies.

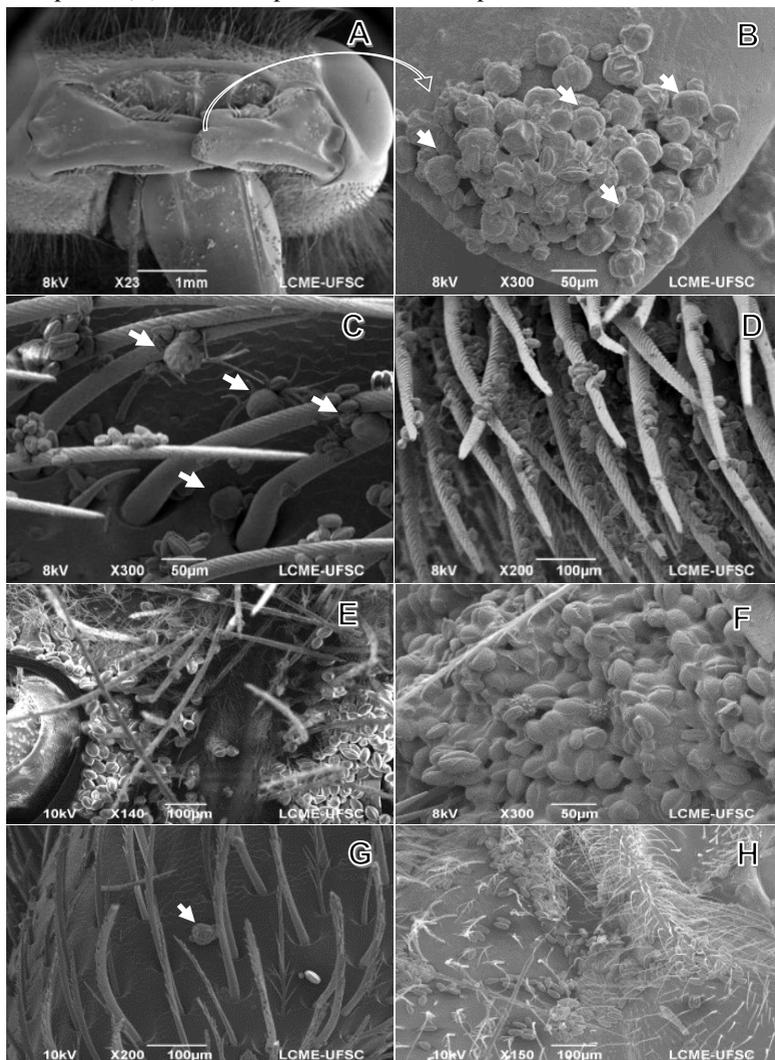
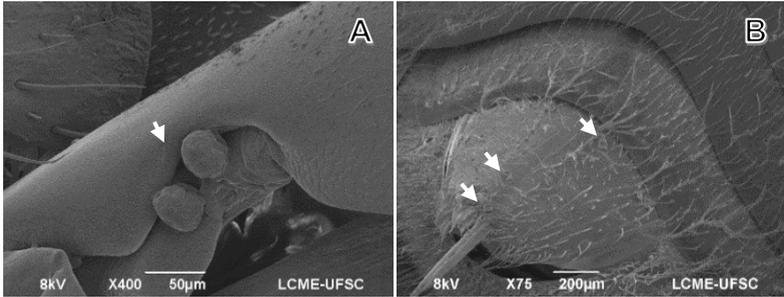


Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando *Apis mellifera* capturada visitando *Gaylussacia brasiliensis*, com pólen desta planta aderido ao corpo (setas brancas). (A) Glossa de com pólen; (B) abdômen com pólen.



Em análise comparativa com estudos realizados em *G. brasiliensis* no Cerrado, em diferentes tipos de vegetação, foram detectados ecotipos de polinização. Populações da mesma espécie diferem nos traços florais no que se refere as dimensões e a produção de néctar potencial (Tab. 4).

Em borda de Mata de Galeria, em relação a Restinga, as flores apresentaram a corola aproximadamente 50% mais longa, e a produção de néctar potencial médio é o dobro (ARAÚJO; BARBOSA; OLIVEIRA, 2011; ARAÚJO; FARIAS; OLIVEIRA, 2011).

Tabela 4 - Características florais de *Gaylussacia brasiliensis*, comparada em diferentes tipos de vegetação: Restinga (Santa Catarina - SC), Mata de Galeria (Minas Gerais - MG) e Campo Rupestre (MG). Comprimento e abertura da corola (ou maior diâmetro), volume de néctar e concentração de açúcar, visitantes mais frequentemente observados e respectivo comprimento do aparelho bucal.

Local Vegetação	Florianópolis, SC Restinga	Uberlândia, MG Mata de Galeria	Morro do Pilar, MG Campo Rupestre
Síndrome de polinização ¹	Entomófila	Ornitófila	Melitófila
Comprimento corola (mm)	10,0 (± 0,1)	15,4 (± 0,47)	7,3 (± 0,5)
Diâmetro da corola (mm)	2,0 (± 0,01)	5,6 (± 0,16)	2,5 (± 0,3)
	(abertura diam)	(maior diam)	(maior diam)
Volume de néctar potencial por flor (µL)	1,70 (± 0,90) µL	3,6 (± 1,2)	-
Açúcar no néctar (%)	21,2 (± 6,2)	13,5 (± 5,2)	-
Visitantes frequentemente observados	<i>Xylocopa brasilianorum</i> <i>Bombus morio</i> <i>Aellopos ceculos</i>	<i>Chlorostilbon lucidus</i> <i>Amazilia fimbriata</i>	<i>Augastes scutatus</i> Não registrou visita de insetos.
Comprimento das peças bucais (mm)	9,7 (± 0,8)	17,7 (± 2,1)	18,5 (± 1,6)
(respectivamente)	9,5 (± 1,3)	21,8 (± 6,2)	
	17,0 (?)		
Referência		Araújo, Barbosa e Oliveira, (2011); Araújo, Farias e Oliveira, (2011)	Rodrigues (2011)

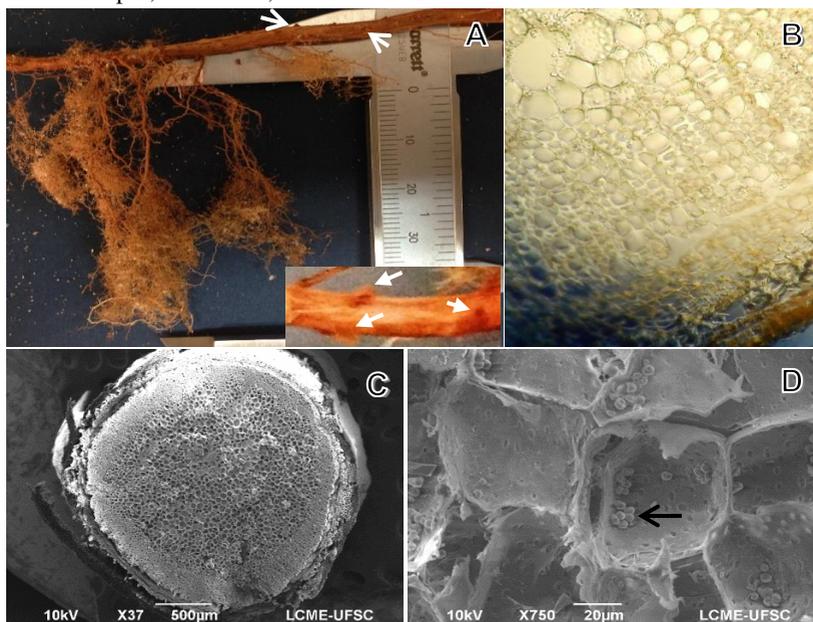
¹Segundo observações dos autores.

Enquanto que, em Campo Rupestre as flores apresentaram comprimento da corola aproximadamente 30% menor em relação a Restinga (RODRIGUES, 2011). Também houve uma grande diferença entre as flores do Cerrado em diferentes tipos de vegetação, onde as flores de borda de Mata de Galeria apresentaram aproximadamente o dobro de comprimento da corola em relação as flores de Campo Rupestre. As observações de visitantes florais mais frequentes também indicaram diferenças na presença de potenciais polinizadores.

1.3.4. Caracterização do *lignotuber*

A estrutura subterrânea responsável pela propagação vegetativa foi caracterizada como *lignotuber* (Fig. 17), tendo como característica imprescindível e definitiva para essa classificação a presença de gemas acessórias epicórmicas (Fig. 17A) (APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2003).

Figura 17 - Sistema subterrâneo de *Gaylussacia brasiliensis*. (A) *lignotuber* contendo gemas acessórias epicórmicas (setas brancas), emitindo raízes estruturais e capilares; (B) secção transversal do *lignotuber* em microscopia óptica; (C, D) *lignotuber* em microscopia de varredura; (C) vista geral e (D) detalhe do parênquima medular contendo grãos de amido (seta). Parênquima medular = pm; súber = su; sistema vascular = sv.



1.4. DISCUSSÃO

A viabilidade total das sementes de *G. brasiliensis* no período de 12 anos, foi de aproximadamente um terço. Os resultados mostram que o fator tempo de armazenagem não interfere na viabilidade das sementes. A longevidade das sementes é um indicativo direto de comportamento de armazenagem ortodoxo (CHIN; KRISHNAPILLAY, 1989; HAY; PROBERT, 2013), sendo que, esta característica é frequentemente observada em Ericaceae (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1985b), em bancos de sementes persistentes (BASKIN; BASKIN, 2014).

Esta é uma estratégia de sobrevivência e propagação em ambientes que apresentam períodos que não favorecem o estabelecimento das plântulas. A dormência da semente significa que são necessárias que condições adicionais sejam satisfeitas antes da germinação acontecer (HOPKINS, 2005). Existe alguma variação de dormência entre espécies de ericáceas, grande parte parece ter dormência fisiológica, outras como *Vaccinium angustifolium* e *V. ashei* possuem dormência morfofisiológica, e algumas, como *Gaultheria leucocarpae*, não apresentam dormência (BASKIN; BASKIN, 2014). Em algumas ericáceas da Austrália com frutos tipo drupas, a dificuldade na quebra de dormência foi associada as interações entre o endocarpo, dormência fisiológica e morfológica, indicada pelo teor de umidade, das características dos frutos, sementes e embriões (JUST, 2018).

Para determinar o tipo de dormência de sementes de *G. brasiliensis*, e o que ocasiona a quebra de dormência, são necessários estudos específicos, uma vez que, estas parecem não responder a tratamentos de quebra de dormência físicos. Alguns estudos foram conduzidos avaliando a relação com a germinação de *Calluna vulgaris* e fungos endofíticos, houve indício de que possa existir uma influência positiva (KNUDSON 1929; RAYNER, 1929). Principalmente devido à complexidade das interações, ainda hoje se encontram dificuldades para elucidar estes processos simbióticos.

Nos anos de estudo a sazonalidade não interferiu na proporção entre sementes com conteúdo e vazias. A viabilidade das sementes (com conteúdo) também não parece ter sofrido influência sazonal. Indicando que a presença de polinizadores não se altera sazonalmente, pois existe disponibilidade de recursos florais durante todo o ano. No período de estudo, a população de plantas apresentou padrão de floração contínuo, variando em intensidade, mostrando indivíduos em todas as fases fenológicas ao mesmo tempo em todos os meses do ano. Floração e

frutificação ao longo do ano foram observadas em outros ecossistemas, com pequenas variações possivelmente devido a condições climáticas (ARAÚJO; BARBOSA; OLIVEIRA, 2011; MORAES, 2011; SILVA; CERVI, 2006; ZAMITH; SCARANO, 2004)

As variações observadas entre a proporção de sementes cheias e vazias entre as amostragens parecem ser aleatórias. Pode estar refletindo questões climáticas, variação na presença de polinizadores, ou mesmo amostragem insuficiente. Durante o período de estudo, a partir do ano de 2015, houve uma mudança na vegetação local, com aumento da população arbustiva, com acúmulo de água das chuvas em pequenas lagoas e córregos. A mudança na composição da flora pode ocasionar a mudança da fauna associada, ocasionando alterações na dinâmica de polinização (COSTA et al., 2017).

Em relação ao tipo de cruzamento, existem alguns indícios de que *G. brasiliensis* possa apresentar xenogamia facultativa. a relação pólen-óvulo de aproximadamente 1.200, de acordo com a classificação indicada por Cruden (1977), indica algum nível de autoincompatibilidade, assim como é observado em espécies de *Vaccinium* (BREVIS et al., 2006; STEPHENS; LEVESQUE; DAVIS, 2012).

Além disso, Luteyn (2002) sugere que muitas espécies com alta densidade de flores sempre produzirem muitos frutos também leva a hipótese de que elas são autocompatíveis facultativas, mesmo que não se possa excluir a polinização cruzada. A presença de muitos indivíduos clonais nas populações de *G. brasiliensis*, produzidos vegetativamente por meio de *lignotuber*, pode tornar a xenogamia facultativa uma garantia de produção de sementes. *Agarista revoluta* (Ericaceae) foi observada em Restinga possuindo indivíduos autocompatíveis e incompatíveis (MOREIRA; MIRANDA; LIMA, 2017).

Outro indício de algum nível de autoincompatibilidade, esporofítica ou gametofítica, é a proporção de sementes sem embrião (dois terços) mesmo com a presença de polinizadores. No entanto, para obter resultados sobre o tipo de cruzamento desta espécie, neste tipo de vegetação, é necessário realizar estudos específicos, preferencialmente a campo.

No Parque das Dunas da Lagoa da Conceição as flores de *G. brasiliensis* são visitadas por insetos capazes de produzir sonicação e com aparelho bucal longo o suficiente para alcançar o nectário e transportar pólen para outros estigmas. Foram identificados como potenciais polinizadores as abelhas grandes *Bombus morio* e *Xylocopa brasilianorum* e a mariposa *Aellopos ceculus*. Para a identificação de *A.*

ceculos foi realizada pesquisa bibliográfica, no entanto, este é um gênero pouco estudado. As evidências de que se trata desta espécie se dá principalmente por suas características peculiares de voo e as manchas amareladas no dorso (Apêndice B).

Neste ecossistema parece que *G. brasiliensis* possui uma relação de polinização mais eficiente com esta evasiva mariposa beija-flor, ela coleta néctar pairando e produzindo vibração, ocasionando a utilização mais eficiente dos recursos florais, e não acontece pilhagem. No corpo da mariposa o pólen puro de camarinha estava depositado apenas na probóscide, com a qual toca o estigma das flores visitadas, são necessários mais estudos para avaliar esta relação. Segundo Mitchell et al. (2009) o forrageamento especializado coincide com a alta eficiência da utilização dos recursos, aumentando a polinização da planta.

A subfamília Macroglossinae contém as chamadas mariposas-beija-flor, com forma aerodinâmica, asas estreitas e o voo rápido, dando a capacidade de pairar nas flores enquanto se alimentam. Os estudos existentes são principalmente sobre as espécies *Macroglossum stellatarum* (BALKENIUS; KELBER, 2006; JOSENS; FARINA, 2001; KELBER, 1996, 1997, 2003; KERN; VARJÚ, 1998; WU; ZENG, 2010), e *Manduca sexta* (BALKENIUS; DACKÉ, 2013; CONTRERAS et al., 2013; HEDRICK, 2006; NGUYEN; HAN; HAN, 2016; WILLMOTT; ELLINGTON, 1997a, 1997b). O gênero *Aellopus* é composto por seis espécies que são pouco estudadas (CANNON, 1985; DRECHSEL, 2014). *A. ceculos* foi observado visitando flores de *Inga* spp. no nordeste do Brasil, durante o dia e também à noite, com pólen em todo o corpo (CRUZ-NETO et al., 2011, 2015).

As abelhas grandes *B. morio* e *X. brasilianorum* fazem frequentes visitas, efetuando a polinização de *G. brasiliensis* em Restinga. Elas possuem um longo aparelho bucal, forrageiam com mau tempo, produzem sonicação (CORTOPASSI-LAURINO; KNOLL; IMPERATRIZ-FONSECA, 2003; FRANÇOSO et al., 2016; MARCHI; ALVES-DOS-SANTOS, 2013) e tocam o estigma com diversas partes do corpo (Fig. 10). As abelhas grandes parecem exercer importância para polinização desta espécie, indicado pela frequência das visitas. No entanto, elas frequentemente apresentam comportamento pilhador (Tab. 2) resultando em visitas ilegítimas, além de explorar diversas fontes de recursos florais, carregando pólen de outras espécies de plantas (Figs. 12A-12H). Abelhas do gênero *Bombus*, especialmente em áreas temperadas, visitam diversas espécies de ericáceas, coletando recursos florais e muitas vezes polinizando (FREITAS; GALETTO; SAZIMA,

2006; JAVOREK; MACKENZIE; VANDER KLOET, 2001; MAYER et al., 2012).

O volume de néctar instantâneo menor do que o de néctar potencial (Fig. 6), sugere que ele está sendo consumido pelos visitantes (DAFNI, 1992), sendo que, as flores tubulares são frequentemente pilhadas por *Bombus* e *Xylocopa* em busca de néctar produzido e armazenado nas câmaras nectaríferas (ROJAS-NOSSA; SÁNCHEZ; NAVARRO, 2016). A pilhagem de recursos florais pode diminuir significativamente a chance de flores obterem sucesso reprodutivo. Este fato pode representar uma força seletiva oposta, e pode ter implicações para a evolução de flores tubulares, que equilibra a seleção para corolas mais longas, muitas vezes direcionadas pelos polinizadores especializados em visitar flores tubulares (NAVARRO; MEDEL, 2009).

As dimensões florais de *G. brasiliensis* em ambiente de Restinga na Ilha de Santa Catarina, em relação as flores do Cerrado em borda de Mata de Galeria e Campo Rupestre, seleciona os potenciais polinizadores. Sendo assim, Araújo, Farias e Oliveira (2011) concluíram que *G. brasiliensis* é troquilófila em borda de Mata de Galeria, onde o bico do beija-flor inserido na câmara nectarífera libera pólen, e a visita por insetos seria pilhagem de néctar. Por outro lado, em Restinga *G. brasiliensis* é entomófila, possivelmente primariamente falenófila e secundariamente melitófila. Pois, grande parte das visitas por abelhas grandes são pilhagem, enquanto que, nas visitas da mariposa beija-flor ocorrem aproveitamento eficiente dos recursos florais de *G. brasiliensis*, e possivelmente em todas as visitas ocorre polinização.

Em *Vaccinium cylindraceum*, uma espécie endêmica do arquipélago de Açores, Pereira (2008) observou variação na morfologia das flores, frutos e sementes, bem como a germinação das sementes entre as populações das sete ilhas, supondo que se tratava de uma resposta adaptativa micro evolucionária (CONNER, 2006; INOUE, 1993). No entanto, o tempo de colonização e evolução de *G. brasiliensis* possivelmente seria insuficiente para determinar a diferença na dimensão floral entre as populações de MG e SC, além disso, as duas populações em MG, no bioma Cerrado, também possuem diferenças entre elas. Sendo assim, possivelmente a variação na dimensão floral é um evento epigenético (ARMBRUSTER et al., 2014; BOSSDORF; RICHARDS; PIGLIUCCI, 2008; HANSEN, 2011; PÉLABON et al., 2013), com a expressão floral adaptada a disponibilidade de polinizadores em diferentes ecossistemas.

Em algumas ericáceas a interação entre a possibilidade de autopolinização e a capacidade para atrair um amplo espectro de polinizadores, pode resultar na não especificidade para uma espécie, ou uma morfologia floral que mantém traços florais mistos (NAVARRO; AYENSA; GUITIÁN, 2007). Se as características florais afetam a polinização, e a polinização afeta o cruzamento, então a conexão funcional entre polinização e cruzamento implica que a seleção que aumenta o sucesso reprodutivo frequentemente resultará em uma correlação na evolução de características florais e sistemas de cruzamento.

Esta plasticidade oferece certa segurança, uma vez que, a dinâmica das espécies polinizadoras é influenciada por perturbações ambientais de forma específica, algumas espécies estão mais sujeitas a perda de diversidade do que outras (BECK; KITCHING; LINSENMAIR, 2006; HADLEY et al., 2017).

Outra importante estratégia de reprodutiva e de sobrevivência de *G. brasiliensis* parece ser a reprodução vegetativa pela produção do *lignotuber*, estrutura especializada até então não descrita em *G. brasiliensis*. O *lignotuber* é um crescimento lenhoso na base do caule, que aparentemente se desenvolveu como fonte de brotos e/ou como órgão de armazenagem de água, carboidratos e nutrientes. O propósito de *lignotuberes* em ericáceas neotropicais é produção de rebrotagens e para armazenamento em taxa sujeitas a fogo e/ou seca. Eles provavelmente também oferecem uma vantagem para as novas mudas em estabelecimento e sobrevivência até a idade da primeira reprodução sexual (JAMES, 1984).

É provável que *G. brasiliensis* possua história de vida com comportamento misto, de semeadora e rebrotadora, como descrito em espécies de *Erica* e outras espécies da ordem Ericales (BELL; PATE; DIXON, 1996; VERDAGUER; OJEDA, 2002, 2005). Desenvolvimento de formas de regeneração é uma variação intraespecífica, geneticamente controlada, baseada na alocação de amido nas raízes e perda da capacidade de rebrota e gemas auxiliares em plântulas oriundas de sementes enquanto se mantém ativas nas oriundas de *lignotuberes*. Os padrões de alocação de reserva na raiz devem ser vistos como respostas plásticas às condições ambientais ao invés de atributos fixos das espécies, pode ser um exemplo de plasticidade fenotípica orientada para o ambiente (VERDAGUER; OJEDA, 2002).

Em *G. brasiliensis* perpetuação e evolução da espécie parecem estar garantidos a longo prazo por meio do banco de sementes ortodoxas, que mantém a recombinação e variabilidade genética. A curto prazo as

populações, cujo nível clonal pode ser alto, mantém a capacidade adaptativa pela estabilidade genotípica e fenotípica. Devido ao fato de estar num ambiente hostil a sobrevivência de plântulas, oriundas de semente pode ser comprometida por algum evento drástico (seca, alagamento, fogo), enquanto que as plântulas oriundas de *lignotuberes* possuem mais resistência a essas condições.

As táticas de empenho reprodutivo e alocação de energia associadas à estratégia de brotamento incluem a manutenção do sistema regenerativo de brotos e carboidratos armazenados em uma matriz lenhosa. Os *lignotubers* representam investimentos substanciais em alocação de energia para apoiar esta estratégia de rebrotamento, assim como as supostas reservas associadas as características da história da vida e síndromes de polinização. Todos são coordenados para maximizar o sucesso individual no objetivo de aumento da capacidade adaptativa.

As estratégias reprodutivas de *G. brasiliensis* permitiram o estabelecimento em ambientes com diferentes níveis de perturbação. O sucesso reprodutivo de *G. brasiliensis* é provavelmente devido a um conjunto de estratégias evolutivas, tais como sementes ortodoxas, permanecendo viáveis e dormentes por muitos anos, e a diversidade nas interações com visitantes florais.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA DE ASSOCIAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E MICORRÍZICOS EM RAÍZES DE *Gaylussacia brasiliensis* EM ÁREA DE RESTINGA

RESUMO

Gaylussacia brasiliensis é nativa do Brasil e ocupa amplo gradiente de latitude e altitude, incluindo a costa litorânea do Nordeste ao Sul. As plantas da família Ericaceae dependem da associação mutualística com fungos para se estabelecerem em nichos com características severas. No entanto, os fungos associados a ericáceas no Brasil são desconhecidos. A plasticidade ecológica de *G. brasiliensis* é, em parte, fornecida pelo mutualismo, assim sendo, suas raízes possuem uma diversa microbiota associada. As estruturas de associação com fungos podem estar relacionadas a composição da vegetação e perturbações ambientais. Sendo assim, a presente pesquisa buscou caracterizar a estrutura de associação entre fungos endofíticos e raízes em *G. brasiliensis*, em vegetação de Restinga em Santa Catarina. Para isso as raízes capilares de *G. brasiliensis* foram amostradas por dois anos, em quatro áreas da Restinga (n = 80 plantas) com diferentes características de vegetação, sendo duas com pouca ação antrópica, uma com presença da invasora *Pinus* sp., e uma em regeneração após queimada. A colonização foi avaliada quantitativamente, e qualitativamente utilizando microscopia confocal a laser (MCL) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para documentar os padrões de colonização de células epidérmicas e os detalhes de complexos de hifas intracelulares. Os resultados mostram a efetiva colonização por fungos nas raízes de *G. brasiliensis*, e que os a colonização por fungos, hifas intracelulares e extra radiculares, variaram em forma e complexidade. Os padrões morfológicos da interação fungo-planta observados, são de micorrizas ericóides, tipicamente descritas, e outros endofíticos. A colonização por fungos nas raízes de *G. brasiliensis* parece ser influenciada quantitativamente e qualitativamente por fatores ambientais, como a mudança na composição da comunidade vegetal, pela invasão de *Pinus* sp. e pela ação de queimada.

Palavras-chave: Anatomia. Fungos ericóides. Interface fungo-planta. Microscopia confocal a laser. Mutualismo.

2.1. INTRODUÇÃO

A associação mutualística entre fungos e plantas da família Ericaceae fornece a estas espécies capacidade adaptativa. A coevolução com esses micro-organismos tornou possível que as ericáceas colonizassem nichos ecológicos com características edáficas e climáticas severas. Ao longo da costa litorânea brasileira é encontrada a vegetação de Restinga, que recebe influência marítima, que possui solo arenoso e com baixo teor de nutrientes.

Os estudos sobre a interação fungo-planta em Ericaceae foram realizados em poucas espécies, principalmente no hemisfério Norte. Sobre o gênero *Gaylussacia*, tipicamente americano, existe muito pouca informação. Sendo que, até então, não existem estudos sobre as características estruturais das interações fungo-raiz em *G. brasiliensis*.

Métodos de análise anatômica e morfológica têm encontrado estruturas diversas de colonização por fungos endofíticos nas especializadas raízes capilares das ericáceas (BONFANTE-FASOLO; GIANINAZZI-PEARSON 1979, 1982; DUDDRIDGE; READ, 1982; MASSICOTTE; MELVILLE; PETERSON, 2005; O'DELL; MASSICOTTE; TRAPPE, 1993; PETERSON; MASSICOTTE; MELVILLE, 2004; RAINS; NADKARNI; BLEDSOE, 2003; READ, 1986) SETARO; KOTTKE; OBERWINKLER, 2006; USUKI; NARISAWA, 2005; VRÅLSTAD; SCHUMACHER; TAYLOR, 2002).

Esta relação mutualística tem se mostrado dinâmica e envolve, em uma mesma planta, uma diversidade morfológica que possivelmente está adaptada a função desempenhada. Apesar de muitos fungos que não formam ErM típicas colonizarem as raízes das ericáceas, não se sabe se a morfologia do tipo de colonização reflete na função (ALLEN et al., 2003; VOHNÍK et al., 2007). Uma característica comum a todas as interações mutualísticas endofíticas é o fornecimento ao hospedeiro de nutrientes e um efeito tampão para estresses do ambiente externo e competição microbiana (SCHULZ; BOYLE, 2005).

As evidências sugerem que a heterogeneidade ambiental em escala da paisagem tem um papel na formação da composição da comunidade fúngica ErM. Fatores ambientais, tais como características edáficas, temperatura, pluviosidade, eventos antrópicos e climáticos, e aspectos geográficos podem fortemente influenciar na diversidade e composição da comunidade de fungos endorrízicos, e possivelmente isto se reflete nas estruturas de associação. Estudos moleculares que avaliaram a composição da comunidade de fungos constataram que, as comunidades

fúngicas associadas a *V. macrocarpon* e *C. vulgaris*, foram significativamente diferentes entre locais e com diferentes usos da terra, o conteúdo de nitrogênio do solo explicou 52% da variação (HAZARD et al., 2014).

Nas comunidades de fungos associados a *C. vulgaris* e *Vaccinium myrtillus* em um gradiente de vegetação, e entre as espécies ocorrendo no sub-bosque foram verificadas diferenças (BOUGOURE et al.; 2007). Em ambiente subártico, na Suécia, foram comparadas as comunidades de fungos endofíticos em quatro espécies de ericáceas coexistentes. Enquanto as espécies de plantas ericáceas que crescem dentro de blocos de 0,15 × 0,15 m compartilham uma comunidade de fungos comuns, as parcelas de 2,0 × 3,0 m de distância abrigou significativamente diferentes comunidades de fungos (KJØLLER; OLSRUD; MICHELSEN, 2010).

A estrutura da comunidade fúngica mudou em um gradiente de altitude, com diferentes características de solo. Gorzelak, Hambleton e Massicotte (2012) concluíram que, na escala da planta hospedeira individual, a facilitação do simbionte pode desempenhar um papel mais importante do que a competição na formação de comunidades fúngicas, pois diversos fungos frequentemente coocorrem, mais do que seria esperado ao acaso.

No entanto, existem poucos estudos que avaliaram a morfologia das associações ericóides em escala de paisagem. Essas interfaces podem indicar a variação na comunidade e funções ecossistêmicas. A identificação da morfologia das estruturas de associações mutualísticas permite um maior grau de replicação e pode ser integrada a estudos moleculares (MASSICOTTE; MELVILLE; PETERSON, 2005).

Sendo assim este capítulo objetivou avaliar o aspecto relacionado a morfologia da interação fungo-planta. Para isso foram documentadas as estruturas de associação de fungos endofíticos e micorrízicos nas raízes de *Gaylussacia brasiliensis*. A avaliação aconteceu em vegetação de Restinga, em áreas diferentes níveis de impacto antrópico, onde houve alteração na composição da vegetação. Observar os traços do sistema radicular, com base em sua anatomia auxiliou a compreensão deste complexo sistema mutualístico, além dos efeitos da interação para a planta e para todo o ecossistema

No sistema radicular de *G. brasiliensis*, em ambiente de Restinga, mostrou a ocorrência de intensa e dinâmica colonização por fungos endofíticos, expressa em diversidade morfológica das estruturas de associação.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Local de estudo e coleta de campo

O estudo foi realizado no Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, que se caracteriza por ter solo Neossolo Quartzarênico e vegetação de Restinga (Fig. 18).

Figura 18 – Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, Município de Florianópolis, Santa Catarina. Sinalizadas as áreas de coletas de raízes para avaliação das estruturas de associação fungo-planta.



As coletas de raízes foram realizadas nos anos de 2015 e 2016 em período próximo ao verão, entre novembro a março (Tab. 5). As amostras foram coletadas em quatro locais com características distintas: dunas fixas com adensamento de camarinha em distribuição aleatória, ou com distintos níveis de distúrbio na composição da vegetação, a saber, com pouca ação antrópica, com presença da invasora *Pinus* spp. e após queimada (Fig. 19, Tab. 5). A autorização para a realização de atividades científicas foi concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO 46847-2), e prefeitura de Florianópolis (E068045/2014).

Os dados de temperatura e precipitação foram obtidos da EPAGRI/CIRAM. As amostras de solo foram processadas no laboratório EPAGRI/CEPAF, para obtenção de dados edáficos sobre atributos químicos.

Figura 19 - Áreas de estudo, de *Gaylussacia brasiliensis*, fotos de janeiro de 2015. (A) A1N com pouca ação antrópica, plantas de *G. brasiliensis* adensadas dunas fixas, terreno suave ondulado a ondulado; (B) A1Q mesmas características da área anterior, A1, após evento de queimada; (C) A3N área com baixa ação antrópica, plantas distribuídas aleatoriamente, terreno plano a baixada; (D) A3P mesmas características da área anterior, A3 com presença da planta invasora *Pinus* spp.



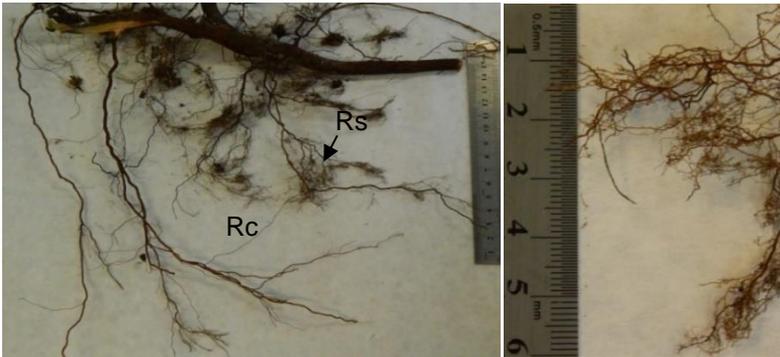
Tabela 5 - Caracterização das áreas de estudo. Áreas A1 e A3, “N” - com baixa ação antrópica, áreas do parque com trilhas utilizadas para recreação, “Q” área em regeneração após queimada e “P” com presença de *Pinus* spp.

Áreas	Coordenadas	Grau de perturbação	Características	Coletas
A1N	Lat. 27°37'46.10"S Long. 48°27'52.23"O	Baixa ação antrópica ¹	Dunas fixas, ondulado, a suave ondulado, plantas adensadas	jan. /15 e fev. /16
A1Q	Lat. 27°37'48.13"S Long. 48°27'46.94"O	Regeneração de queimada (Evento fogo em nov. /15)		
A3N	Lat. 27°36'46.58"S Long. 48°27'16.50"O	Baixa ação antrópica ¹	Dunas fixas, plano, baixada, distribuição aleatória de plantas	mar. /15 e nov. /15
A3P	Lat. 27°36'58.78"S Long. 48°27'16.14"O	Presença da planta invasora <i>Pinus</i> spp.		

Foram amostradas 10 plantas em cada uma das quatro áreas nos dois anos ($n = 80$). Foram estabelecidos transectos paralelos com aproximadamente 30 m entre eles, na direção Leste-Oeste, em intervalos de aproximadamente 8 m ao longo de cada transecto foram coletadas três plantas, adaptados ao local e tamanho da população. Coletou-se amostras de 300 g do solo adjacente a cada planta, de 0 a 20 cm de profundidade, para análise química de nutrientes. As raízes foram acondicionadas em sacos de polietileno, mantidas a 4 °C e processadas para a análise em até uma semana após a coleta

Somente raízes capilares intactas, conectadas à raiz principal (Fig. 20), foram utilizadas. Para cada planta, as raízes foram submetidas a clareamento e coloração para análise de colonização, parte foi mantida em natura e, fixadas em gluteraldeído e preservados em etanol 70% para as análises microscópicas.

Figura 20 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis*, com crescimento secundário (Rs), raízes capilares (Rc).



2.2.2. Análise de colonização

As amostras de raízes foram clareadas com água alcalina (nitrato de amônio, peróxido de hidrogênio e água destilada, 1:1:8) por até 30 min, lavadas abundantemente, mantidas em HCl 1% por 5 min e imersas por 4 h em azul de anilina 0,05% a temperatura ambiente *overnight*, e mantidas em solução de descoloração (água destilada, glicerina e ácido láctico 1:1:1) (KAMINSKYJ, 2008). Posteriormente segmentos das raízes coradas, aproximadamente 5 cm ($n=8$ m de raiz), foram acomodadas em lâminas com PVLG (Poli Vinil Lacto Glicerol) e cobertos por lamínula.

Foram observados em microscopia ótica em aumento de 400 vezes, 100 campos por lâmina, aplicando-se para cada campo de visão um índice de 0 a 4, no qual 0 indica nenhuma célula colonizada; 1 = até 25%; 2 = de 25 a 50%; 3 = 50 a 75%; e 4 = mais de 75% de colonização. Para avaliar a existência de diferença significativa na colonização entre as diferentes áreas e os diferentes anos, os índices foram convertidos em porcentagem e foi aplicado teste de normalidade dos dados Shapiro-Wilk, e então o teste de Kruskal-Wallis, e teste Dunn para verificar a diferença entre as situações analisadas.

2.2.3. Observações morfológicas

Para as avaliações morfológicas das características estruturais das raízes foram adaptados os métodos propostos por Peterson, Massicotte e Melville (2004). Nas observações de raízes frescas em microscopia ótica (MO), as amostras de segmentos radiculares foram seccionadas e colocada em lâminas temporárias com glicerina 50%.

Para microscopia confocal a laser (MCL), amostras de raízes foram preparadas utilizando-se metodologia adaptada de Kaminskyj (2008). Foram observadas raízes *in natura* e clareadas com água alcalina, como descrito acima, ambas coradas com fucsina ácida. Foram aplicadas duas faixas de fluorescência excitação/emissão, excitação 543 nm (verde) e filtro de emissão na faixa de 600–739 nm (vermelho), fluorecendo o tecido fúngico em vermelho; e excitação 488 nm e filtro de emissão 500–570 nm (verde), com a qual a parede celular das raízes autofluoresceu em verde. Para microscopia confocal foi utilizado Microscópio de Fluorescência Leica DMI6000B, e para o processamento final das imagens, foi utilizado o programa Lite LAS-AF (Leica).

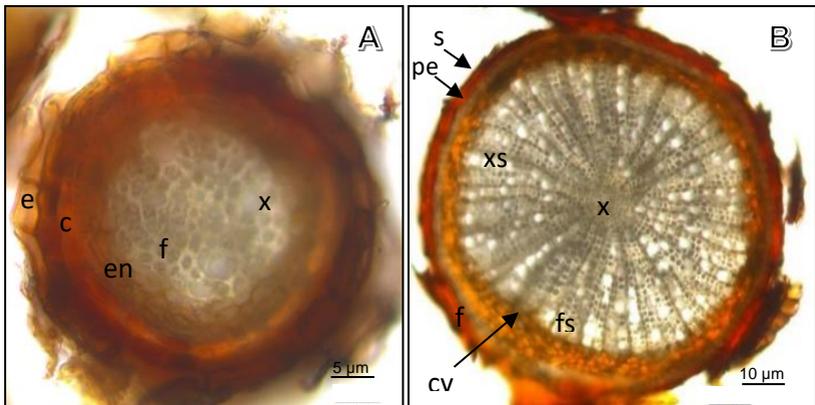
Para microscopia eletrônica de varredura (MEV) segmentos das raízes foram fixados *overnight* em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7,2. O material foi lavado por três vezes em tampão fosfato 0,1 M, e a seguir foi desidratado em série etílica gradual (10 a 100%). Após desidratação total, as amostras foram secas em ponto crítico Leica EM CPD300, e então foram aderidas sobre suportes de alumínio com fita de carbono dupla face, e cobertas com 20 nm de ouro, em metalizador Leica SCD 500. As amostras foram analisadas e documentadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM-6390LV. Todas as imagens de MCL e MEV foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC).

2.3. RESULTADOS

A morfologia do sistema radicular de *Gaylussacia brasiliensis* é dimórfica, composta por raízes estruturais mais grossas, profusamente ramificadas e com crescimento indeterminado, que dão origem as raízes capilares (Fig. 21A). Elas são finas (diâmetro <70 μm) e curtas, com crescimento determinado.

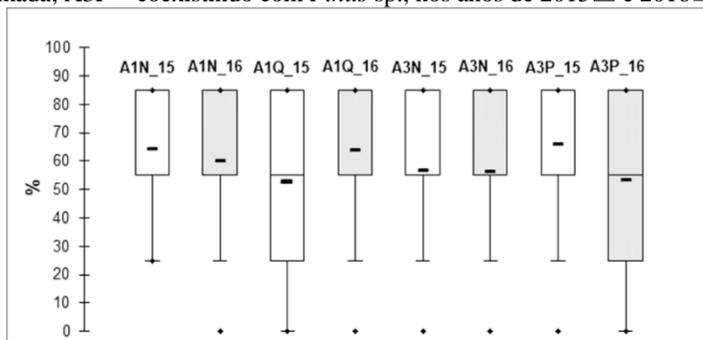
As raízes capilares têm características anatômicas simples e não apresentam crescimento secundário. Consiste de um cilindro vascular estreito, com uma ou duas camadas de células corticais, incluindo a endoderme, e uma camada de células epidérmicas grandes e vacuoladas (Fig. 21A, 23F). As raízes estruturais, apresentam crescimento secundário com diferenciação do câmbio vascular (Fig. 21B), e apresentaram colonização por fungos endofíticos (Figs. 26B, 26C).

Figura 21 - Imagens de microscopia óptica de secções transversais de raízes *Gaylussacia brasiliensis*. (A) raiz capilar *in natura* com células epidérmicas alargadas e parede externa espessada (e), duas camadas de córtex (c), endoderme (en), xilema primário (x), floema primário (f); (B) raiz com crescimento secundário mostrando súber (S), periciclo (pe), floema primário (f), floema secundário (fs), câmbio vascular (cv), xilema secundário (xs), xilema primário.



Os índices de colonização por endofíticos ericóides nas raízes das áreas avaliadas foram maiores que 50% (Tab. 6). No entanto, ocorreu um desvio padrão maior no índice de colonização das raízes coletadas na área A1Q em 2015, dois meses após a queimada, e no ano seguinte, 2016, a média aumentou e o desvio padrão foi menor em relação ao ano anterior. A distribuição dos dados é representada no gráfico (Fig. 22).

Figura 22 - Distribuição dos dados de colonização por fungos endofíticos em raízes de *Gaylussacia brasiliensis* nas quatro áreas de estudo, em área natural, em dois anos. A1N e A3N = baixa ação antrópica; A1Q = regeneração após queimada; A3P = coexistindo com *Pinus* sp., nos anos de 2015 □ e 2016 ▒.



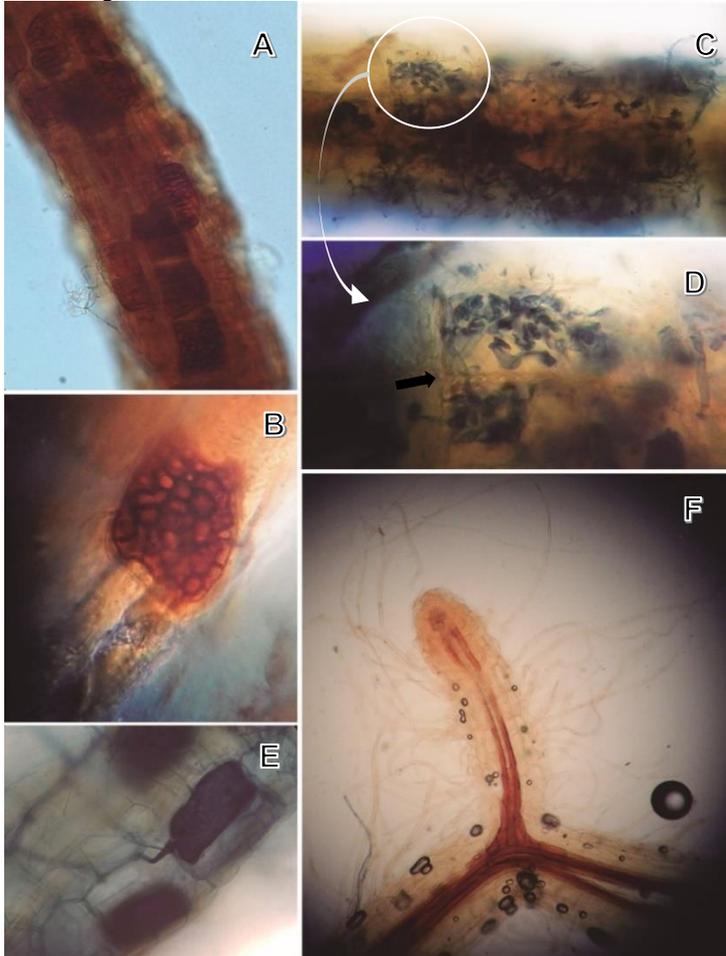
Os dados dos índices de colonização não são paramétricos, e por isso foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para comparação de medianas. Ele indicou haver diferença significativa entre os índices de colonização ($p < 0,0001$) entre os locais, com diferentes níveis de ação antrópica, nos dois anos amostrados (Tab. 6). O teste Dunn para comparação de tratamentos indicou diferença significativa ($\alpha = 0,5$) entre as áreas e anos amostrados, formando três grupos, “C” com maior índice de colonização em A1N, A3P em 2015 e A1Q em 2016, o grupo “A” as menos colonizadas.

Tabela 6 - Índice de colonização por fungos endofíticos em raízes de *Gaylussacia brasiliensis*, de área de Restinga, em diferentes áreas: A1N e A3N = baixa ação antrópica; A1Q = regeneração após queimada; A3P = coexistindo com *Pinus* sp. Teste de Kruskal-Wallis $\alpha = 0,5$; $K(14,07) = 253,5$ $p < 0,0001$. Comparações múltiplas pareadas utilizando teste bilateral Dunn, grupos: A, AB, B, C.

Áreas	Índice de colonização			
	2015	Grupo	2016	Grupo
A1N	63,8 ($\pm 19,3$)	C	60,0 ($\pm 21,0$)	B
A1Q	52,6 ($\pm 29,0$)	A	63,5 ($\pm 22,1$)	C
A3N	56,6 ($\pm 22,7$)	AB	55,8 ($\pm 23,0$)	A
A3P	65,5 ($\pm 18,7$)	C	53,0 ($\pm 26,8$)	A

Na microscopia foram observadas raízes densamente colonizadas por fungos com hifas melanizadas (DSEs) (Figs. 23A, 23B, 23E), e hifas escuras penetrando a epiderme (Figs. 24E, 24F). Também colonização por fungos endofíticos com hifas hialinas (EF) (Fig. 23D, 23E).

Figura 23 - Raízes capilares de *Gaylussacia brasiliensis* em microscopia óptica, (A) *in natura* com intensa colonização por fungos septados escuros (DSE); (B) detalhe de célula colonizada por DSE; (C) com rede frouxa de hifas hialinas extra radiculares (azul de anilina); (D) detalhe de célula colonizada por fungo endófito com parede espessada (seta preta); (E) micorriza ericóides colonizando células através da parede celular (azul de anilina); (F) raiz capilar clareada com água alcalina, com hifas extra radiculares.



Raízes de plantas coexistindo com *Pinus* apresentaram raízes modificadas colonizadas (Figs. 24B, 24C) e com escleródios (Fig. 24A). Em raízes em regeneração de queimada foram observadas outras estruturas fúngicas (24D).

Figura 24 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis* (A-C) coexistindo com *Pinus* sp.; (A) estrutura colonizada por fungos com escleródios (seta preta); (B, C) microscopia óptica (MO) mostrando colonização de raízes curtas com estrutura modificada; (D) MO de raiz oriunda de área de queimada com estrutura de colonização e com estruturas eletrodensas (setas pretas) (corada com azul de anilina); (E, F) raízes *in natura*, de área com baixa ação antrópica, mostrando hifas melanizadas penetrando a epiderme.



As imagens de MCL mostram estruturas de associação com diferentes padrões de colonização, em áreas com baixa ação antrópica (Figs. 24A-24F, 25A-25C, 26A-26C), nas áreas em regeneração após queimada (Figs. 24D, 26D, 26C) e coexistindo com *Pinus* spp. (Figs. 25E, 25F). Foram observadas estruturas tipo microescleródios intracelulares em todas as áreas, mas principalmente na área em regeneração de queimada (Fig. 25D). Foram caracterizadas como ErM típicas, comparando-se com as estruturas já descritas (PETERSON; MASSICOTTE; MELVILLE, 2004), dois padrões de estrutura, um com hifas grossas ($\cong 5 \mu\text{m}$ diam) pouco adensadas, colonizando intra e intercelularmente (Fig. 25A). Outro padrão observado são hifas delgadas e densamente organizadas intracelularmente (Fig. 25B, 26A).

Figura 25 - Imagens de microscopia confocal a laser (MCL) de raízes de *Gaylussacia brasiliensis*, tecido fúngico fluorescendo em vermelho (fucsina ácida). (A-C) Raízes capilares de área com pouca ação antrópica; (A) padrão de micorriza ericóides com hifas grossas; (B) micorriza ericóides com hifas delgadas, (C) com colonização intensa em ramificação lateral. (D) Raiz de área em dois meses regeneração após queimada, estruturas intracelulares semelhantes a microscleródios (seta branca); (E-F) raízes coexistindo com *Pinus* sp., (E) mostrando células colonizadas (seta branca); (F) com crescimento secundário, colonização intercelular (seta branca).

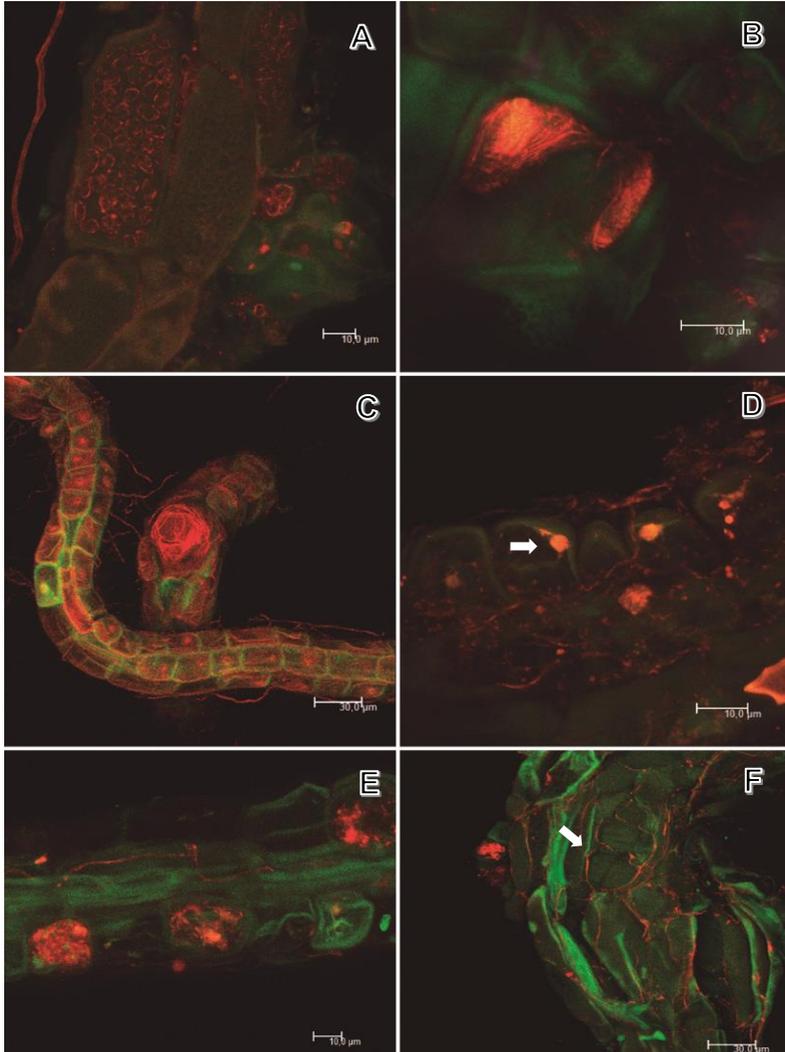
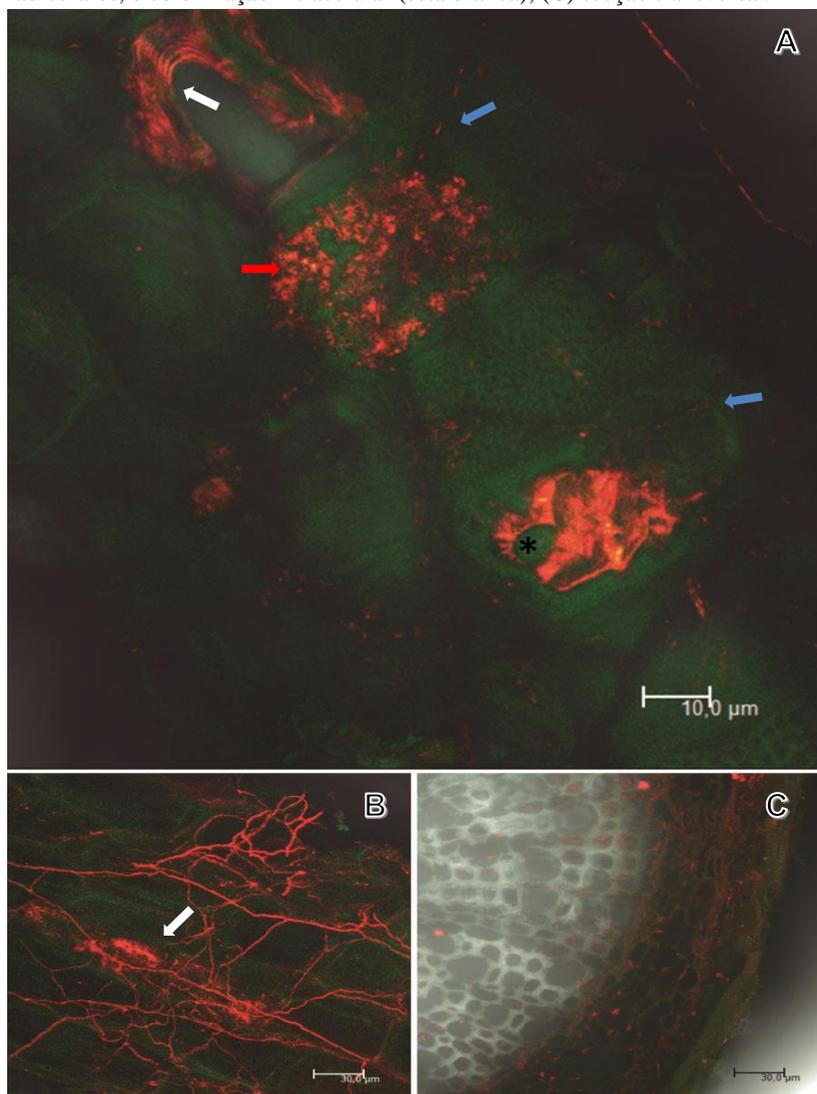
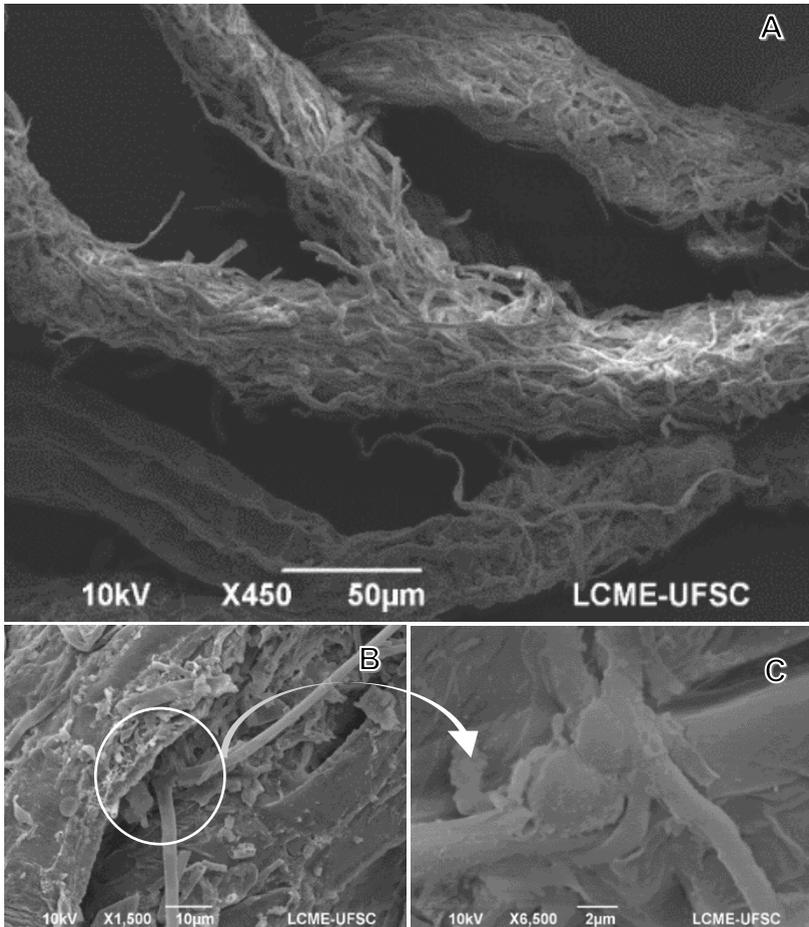


Figura 26 - Imagens de microscopia confocal a laser de raízes de *Gaylussacia brasiliensis* coradas com fucsina ácida, de áreas Restinga com pouca ação antrópica, fungos fluorescendo em vermelho. (A) Micorriza ericóide, possivelmente em diferentes estádios de desenvolvimento, fase inicial de colonização hifas próximas a parede (seta branca), em fase de degeneração (seta vermelha), núcleo da célula vegetal (*?), pontos de infecção (setas azuis). (B-C) Raiz com crescimento secundário colonizada por fungos, (B) hifas extra radiculares, e colonização intracelular (seta branca); (C) secção transversal.



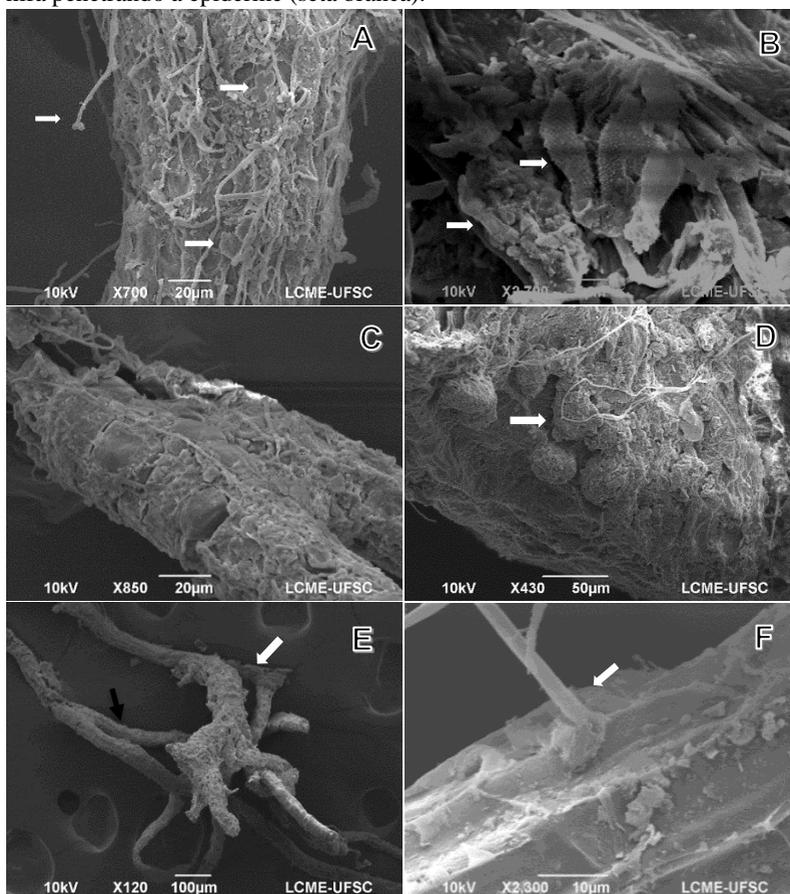
Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram encontradas em algumas raízes redes de hifas extra radiculares soltas e mais adensadas, formando uma bainha de hifas (Figs. 27A). Também se observou penetração de fungos na epiderme das raízes por apressórios (Figs. 27B, 27C) e diretamente por hifa (Fig. 28F). Outras diversas estruturas extra radiculares, possivelmente fúngica, foram observadas (Figs. 28A, 28B).

Figura 27 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis* em áreas com pouca ação antrópica em Microscopia Eletrônica de Varredura. (A) Rede extra radicular de hifas; (B) Fungo penetrando a epiderme da raiz por espaço intercelular, (C) detalhe da estrutura similar a apressório.



As raízes oriundas da área em regeneração após queimada mostraram colonização por fungos com estrutura extra radicular irregular (Figs. 28D). Algumas raízes apresentaram modificação na morfologia semelhantes a EcM (Fig. 27E), outras raízes mostraram poucas hifas extra radiculares (Fig. 27F).

Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura em raízes de *Gaylussacia brasiliensis*. (A, B) raízes estruturais de área com baixa ação antrópica com presença de hifas e estruturas extra radiculares (setas brancas). (C-E) Raízes de área com dois meses regeneração após queimada; (C) raiz com hifas extra radiculares; (D) micélio extra radicular com estrutura irregular; (E) raiz com morfologia modificada pela presença de fungos (seta branca), raiz com poucas hifas extra radiculares (seta preta); (F) raiz de planta coexistindo com *Pinus* sp., hifa penetrando a epiderme (seta branca).



Os dados ambientais do período de estudo, características climáticas (Tab. 7) e edáficas (Tab. 8) foram tomados como dados complementares. Ocorreu uma precipitação acumulada maior na primavera de 2015 em relação as outras estações no período de estudo.

Tabela 7 - Médias sazonais e desvio padrão de dados do período de junho de 2014 a junho de 2016. Temperaturas (Temp.) médias, máximas, mínimas (°C) e precipitação acumulada (mm).

Estação/ ano	Temp. média °C	Temp. máx. °C	Temp. mín. °C	Precipitação mm
Inverno/ 14	17,5 (± 0,3)	28,1 (± 3,9)	6,2 (± 0,5)	331,0
Primavera/ 14	21,5 (± 1,6)	31,5 (± 1,0)	12,7 (± 1,1)	301,7
Verão/ 15*	25,2 (± 0,9)	35,1 (± 1,7)	18,3 (± 1,3)	548,8
Outono/ 15	21,7 (± 2,2)	28,9 (± 2,4)	14,4 (± 3,5)	475,6
Inverno/ 15	18,5 (± 1,4)	29,6 (± 3,8)	8,1 (± 3,0)	383,6
Primavera/ 15	20,0 (± 1,4)	30,2 (± 1,2)	11,6 (± 4,3)	759,2
Verão/ 16*	24,8 (± 0,7)	34,6 (± 0,7)	17,9 (± 0,7)	571,6
Outono/ 16	21,6 (± 3,8)	30,3 (± 5,0)	10,8 (± 5,0)	472,3

Fonte: EPAGRI – CIRAM.

Tabela 8 - Atributos do solo coletado subjacente às raízes das plantas amostradas, nas quatro áreas de estudo e 2 anos. A1N e A3N = pouca ação antrópica; A1Q = área em regeneração após queimada; A3P = com a presença de *Pinus* spp.

Atributo	Unidade	Áreas e anos amostrados							
		A1N		A1Q		A3N		A3P	
		2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016
pH água	-	4,2	4,5	4,9	4,8	4,4	3,9	3,9	4,8
pH SMP	-	6,4	6,5	6,3	6,5	6,3	6,3	6,5	6,5
CTC	cmolc.dm ⁻³	5,2	4,7	6,0	4,8	5,1	5,1	4,4	4,4
M.O.	%	2,4	2,4	2,4	2,3	2,5	2,0	2,8	1,8
P	mg.dm ⁻³	6,3	3,5	4,2	4,6	3,5	1,9	2,5	2,0
K	mg.dm ⁻³	16,0	8,0	40,0	20,0	20,0	16,0	16,0	12,0
Al	cmolc.dm ⁻³	0,2	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,4	0,2
Ca	cmolc.dm ⁻³	2,2	2,1	2,5	2,2	1,9	1,9	1,8	1,8
Mg	cmolc.dm ⁻³	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Zn	mg.dm ⁻³	<0,2	0,2	0,7	<0,2	0,3	0,4	0,4	0,5
Cu	mg.dm ⁻³	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	0,2	3,9	0,8
Mn	mg.dm ⁻³	<2,5	<2,5	8,8	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	3,7
Fe	g.dm ⁻³	1,1	1,5	1,3	1,1	2,2	2,5	3,8	1,9

2.4. DISCUSSÃO

A família Ericaceae é conhecida por formar associação mutualística diversa de endófitos fúngicos. Apesar disso, os aspectos estruturais das micorrizas foram estudados para poucas espécies. Uma característica unificante das espécies desta família é a formação de raízes

capilares. As raízes capilares são finas, laterais e muito especializadas, adaptadas para abrigar os fungos endofíticos e micorrízicos, com células epidérmicas grandes e vacuoladas. McLennan (1935 apud DIXON; SIVASITHAMPARAM; READ, 2004) descreveu a raiz micorrízica ericóide como compreendendo células epidérmicas hipertróficas, com matriz de hifas endofíticas auxiliares, cercando uma exoderma e uma estela monarca.

O sistema radicular de *G. brasiliensis* é similar a outros já descritos em ericáceas, composto por raízes estruturais, com crescimento secundário e raízes capilares, ambas com diversas ordens de ramificação (ROSE SELWIN; SENTHILKUMAR, 2016; VALENZUELA-ESTRADA et al., 2008). Raízes capilares podem ser produzidas a partir de todas as ordens de raízes. A presença de fungos parece estimular a ramificação (PETERSON; MASSICOTTE; MELVILLE, 2004). O sistema de raízes capilares e a biomassa fúngica podem ocupar até 80% do sistema radicular de *Calluna* (READ, 1983).

Raízes com crescimento secundário, também apresentaram colonização por fungos endofíticos em todas as camadas de tecido radicular. No entanto, o micélio fúngico parece estar em sua maior parte localizado entre as células, diminuindo a intensidade de colonização à medida que se aproxima do cilindro central (Fig. 27C). Tanto o córtex quanto a epiderme contêm compostos fenólicos, e neles podem ocorrer associações fúngicas (ASHFORD; ALLAWAY; REED, 1996).

O índice de colonização foi relativamente alto em todas as áreas analisadas, com aproximadamente 50% das células das raízes ocupadas por fungos. Os dados de colonização (Tab. 6; Fig. 22) indicam que, a maior dispersão dos dados aconteceu na área após queimada em 2015. Isso possivelmente é um efeito do evento de queimada, e o retorno ao padrão de colonização, semelhante ao das áreas com baixa ação antrópica poderia estar indicando uma boa capacidade de regeneração da comunidade de fungos por adaptação, mas certamente estimulada pela disponibilidade de nutrientes liberados pela queima de material orgânico (Tab. 8).

Na área onde as plantas estavam coexistindo com *Pinus* houve no ano de 2016 o menor índice de colonização entre as amostras. Talvez exista uma relação com a pluviosidade da primavera de 2015 (Tab. 7), pois a área (A3N), é sujeita a alagamento, em baixada plana a nível do mar, e a água se acumula superficialmente no perfil de solo, podendo afetar o nível de oxigênio na rizosfera e pode haver posterior lixiviação de nutrientes.

As células epidérmicas de raízes capilares estavam colonizadas mais ou menos densamente por micélio fúngico, com hifas soltas ou mais compactadas e com diferentes tipos de hifas. Nas células epidérmicas colonizadas, o núcleo vegetal move-se para uma posição central e pode haver espessamento da parede celular. As paredes espessas podem funcionar como fonte de nutrientes para o fungo, e como proteção do complexo de hifas durante períodos de seca, também as células contendo complexos de hifas podem atuar como propágulos do fungo (ASHFORD; ALLAWAY; REED, 1996).

As características morfológicas, típicas da colonização por micorrizas ericóides, envolvem a infecção de células epidérmicas por hifas, por meio de fibrilas, formação de um complexo de hifas ramificadas, enovelamento, em cada célula colonizada (PETERSON; MASSICOTTE; MELVILLE, 2004). Foram observados dois padrões de colonização que parecem corresponder a micorrizas ericóides, tipicamente descritas, que diferem no calibre das hifas, uma possui hifas de maior diâmetro e com maior presença de micélio intracelular (Fig. 25A) em relação a outra, que possui hifas muito finas que iniciam a colonização com organização paralela junto a parede celular do simbionte (Fig. 25B).

Massicotte, Melville e Peterson (2005) observaram basicamente dois padrões que associaram a estrutura de associação de micorrizas ericóides, em raízes de cinco espécies de ericáceas. O tipo mais comum por eles observados possui colonização inicial nas células epidérmicas, muitas vezes próxima à parede celular, seguido de ramificação e enrolamento de hifas organizadas frouxamente, formando um complexo intracelular de hifas. O segundo tipo forma densos rolos de hifas intracelulares ocupando a maior parte do volume da célula epidérmica “coils” (MASSICOTTE; MELVILLE; PETERSON, 2005). Padrões de associação semelhantes foram mostrados em raízes capilares de *Vaccinium vitis-idaea* colonizado por *Hymenoscyphus ericae* (VRÅLSTAD; SCHUMACHER; TAYLOR, 2002), e *Rhododendron* colonizado por *Heteroconium chaetospira* (USUKI; NARISAWA, 2005).

A microscopia confocal mostrou hifas muito finas, conectadas a um complexo de hifas entre células adjacentes na epiderme (Figs. 26A), indicando que um ponto de entrada de fungos pode resultar na colonização de mais de uma célula epidérmica. As hifas conectoras são de diâmetro muito pequeno, não podendo ser facilmente visualizadas por microscopia convencional e de transmissão e, os fungos são capazes de

produzir diferentes estruturas fúngicas como ligações intercelulares (MASSICOTTE; MELVILLE; PETERSON, 2005; PETERSON; MASSICOTTE; MELVILLE, 2004).

Foi observada a entrada de fungos nas células epidérmicas das raízes por estrutura do tipo apressório (Fig. 27C). Este tipo de estrutura de penetração já foram descritas em fungos endofíticos (CAIRNEY; ASHFORD, 2002; USUKI; NARISAWA, 2005), e também em micorrizas ericóides (BONFANTE-FASOLO; GIANINAZZI-PEARSON, 1979, 1982; DUDDRIDGE; READ, 1982).

A colonização por fungos endofíticos se mostrou frequente nas raízes de *G. brasilienses*, possivelmente indicando a importância desta relação mutualística. A colonização por endofíticos começa com hifas superficiais que formam uma rede solta sobre a superfície da raiz, as hifas individuais crescem ao longo do eixo principal da raiz, podem crescer entre as células corticais, e em depressões entre as células da epiderme (O'DELL; MASSICOTTE; TRAPPE, 1993). A colonização pode ser também intracelular, e endofíticos podem formar aglomerados densos, estreitamente ligados no interior das células corticais, chamada massa pseudoparenquimatosa, um tecido fúngico composto por hifas agregadas, nos quais a origem hifal das células é menos óbvia (O'DELL; MASSICOTTE; TRAPPE, 1993).

Na área com baixa ação antrópica foram observadas diversas estruturas extra radiculares, rede de hifas extracelular organizada de forma frouxa formando uma bainha de hifas (Fig. 27A). A extensão do desenvolvimento das hifas superficiais nas raízes capilares é variável. Muitas das hifas nas superfícies das raízes capilares são hifas do tipo “*runner*”, de paredes grossas, e mais extensas, das quais se desenvolvem ramos laterais que entram nas células epidérmicas, ou crescem através do solo em busca de outras raízes (PETERSON; MASSICOTTE; MELVILLE, 2004). Segundo Read (1996), a extensão do micélio extra radicular em micorrizas ericóides é muito limitada, e isso pode decorrer do fato de que o extenso sistema de raízes capilares desempenha o papel principal na exploração do solo.

Associações micorrízicas com bainha de hifas e colonização por hifas inter e intracelulares foram observadas em ericáceas neotropicais, e denominadas cavendishioides (SETARO; KOTTKE; OBERWINKLER, 2006). Este tipo de associação, com bainha de hifas tipo manto, foram encontradas em outras ericáceas neotropicais (RAINS; NADKARNI; BLEDSOE, 2003), e em espécies de ericáceas no Canadá, vezes mostrando um manto compacto de hifas, e outras um arranjo de hifas

soltas na superfície da raiz (MASSICOTTE; MELVILLE; PETERSON, 2005).

A fase de desenvolvimento da associação é outro fator que influencia na morfologia. A longevidade de qualquer complexo epidérmico-hifal é variável, visto que a degradação dos citoplasmas hospedeiro e fúngico ocorrem em algumas semanas, e é aceito que há uma rápida transformação das raízes destas raízes finas no solo (PETERSON; MASSICOTTE; MELVILLE, 2004). Para observar o estágio de desenvolvimento da associação ErM, foi utilizado diagrama desenvolvido por Bizabani (2015) em raízes de *Erica* (Anexo C). Sendo assim, diferenças nas estruturas de associação pode ser resultado de diferentes estádios de desenvolvimento (Fig. 26A). No estágio inicial da colonização, em que começa organização de hifas próximo a parede, a célula fica preenchida por hifas e logo após ocorre a degeneração de ambos os citoplasmas fúngico e vegetal. Em espécies de *Erica*, estimou-se a longevidade do complexo epidérmico-hifal em onze semanas, quando as células vegetais entram em colapso e a estrutura da associação se desfaz (BIZABANI, 2015).

Em raízes oriundas de área com regeneração de dois meses após queimada, foram observados microescleródios (Fig. 25D), possivelmente com função de estrutura de resistência e propagação. O escleródio é uma massa firme de hifas, frequentemente arredondada, com ou sem adição de tecido do hospedeiro ou solo, normalmente sem produção de esporos externa ou internamente, no entanto, um escleródio pode dar origem a um corpo de frutificação, um estroma ou micélio (KIRK et al., 2008). Stoyke e Currah, (1993) descreveram microescleródios formados por *Phialocephala fortinii* dentro de células individuais, entre as camadas epidérmica e subepidérmica, e dentro das células que cercam o ponto de emergência de raízes laterais, sem invasão do cilindro central da raiz.

Os microbiontes que sobreviverem ao fogo terão condições plenas para o crescimento da comunidade que ali se estabelecer, o fogo altera a disponibilidade de nutrientes (Tab. 8), substratos orgânicos e inorgânicos e outros componentes bióticos com os quais os fungos interagem, o que possivelmente favorece a diversidade (MCMULLAN-FISHER et al., 2011). Pouco se sabe sobre a dinâmica do banco de propágulos fúngicos, que incluem esporos, fragmentos de hifa, escleródios e outras estruturas de repouso.

Escleródios também foram observados em raízes de plantas coexistindo com *Pinus* (Figs. 24A-24C), e raízes ramificadas com morfologia modificada pela presença de fungos, como é característico de

outros tipos de associação, ectomicorriza, arbutóide e monotropóide (MASSICOTTE et al., 1993; PETERSON; MASSICOTTE; MELVILLE, 2004).

Diferentes estruturas da associação de fungos endofíticos ericóides, podem ser resultado da diversidade de táxon fúngico envolvido. Como observado por McLean et al. (1998), certos táxon produzem enovelamentos densos que enchem completamente as células epidérmicas, enquanto outros produzem enrolamento solto durante a infecção, sugerindo que a intensidade de enovelamento pode ser dependente dos táxon fúngicos.

Entretanto, a diversidade estrutural também é dada pela resposta do hospedeiro à infecção e pela plasticidade ecológica características dos fungos endofíticos (SCHULZ; BOYLE; SIEBER, 2006), que podem produzir estruturas reprodutivas, de resistência e desenvolver interfaces para funções ecológicas específicas. Esta regulação provavelmente ocorre pela sensibilidade a estímulos externos como fatores abióticos e bióticos.

Não foi possível detectar a presença de membrana perifungal nas estruturas intracelulares observadas, como acontece em simbiose com fungos biotróficos AMF (GENRE et al., 2012). A membrana plasmática contém abundante material eletrodense, a microscopia de transmissão é mais adequada para observar este tipo de estrutura. Em muitas interações estudadas as hifas fúngicas dentro das células epidérmicas são cercadas pela membrana plasmática do hospedeiro, separado o citoplasma da planta por uma membrana derivada do tecido vegetal, que invagina seguindo o crescimento fúngico e a formação do enovelamento (BONFANTE; GIANINAZZI-PEARSON, 1979).

Esta interface entre simbioses foi observada em micorriza ericóide (BRIGGS; ASHFORD, 2001; PEROTTO et al., 1995), e supostamente tal posição no apoplasto proporciona uma área superficial de troca de material entre os organismos simbioses (CAIRNEY; ASHFORD, 2002). Em contrapartida, os poucos estudos ultraestruturais em interface entre endofíticos e plantas indicam que as hifas intracelulares não possuem membrana perifungal derivada de hospedeiro e material de matriz interfacial (PETERSON; WAGG; PAUTLER, 2008). Isso levanta questões relativas ao mecanismo de troca de nutrientes entre esses fungos e células vegetais. Abordagens que incluem citologia molecular e imagem viva são necessárias para determinar as mudanças iniciais nas células da planta quando invadidas por endofíticos.

Na prática as classificações baseadas em morfologia, de micorrizas ericóides ou endofíticos, são de aplicação difícil e complexa. Pois as

estruturas coocorrem, além disso, entre os tipos de associação existem interfaces filogenéticas e funcionais que as tornam muito diversificadas e versáteis.

As estruturas morfológicas são dinâmicas, assim como a composição da comunidade. Alguns fatores conhecidamente afetam a dinâmica da composição da comunidade de fungos ErM. Read (1996) observou que, cada regime de umidade provoca um padrão distinto de desenvolvimento sazonal do sistema de raízes colonizados por ericóides. Mudanças sazonais e fatores ambientais, como temperatura, precipitação, e a disponibilidade de nutrientes, podem ser relacionados com variações observadas em comunidades de fungos (ZHANG et al., 2016).

Em áreas com diferentes características de vegetação determinadas pela ação antrópica os padrões de colonização, a morfologia do complexo das hifas e a estrutura das células epidérmicas apresentaram diversos padrões. No entanto, não se pode afirmar que existem diferenças entre as estruturas nas diferentes áreas e situações avaliadas, ou que a presença da planta exótica *Pinus* e o evento de queimada, afetam ou determinam os tipos de estruturas de associações planta-fungo, pois não foram realizadas repetições suficientes para essa conclusão. Pode-se afirmar que as estruturas que compõe as associações entre fungos endofíticos e *G. brasiliensis*, são diversificadas e que possivelmente estão associadas a função que estão desempenhando em escala de planta individual e/ou ecossistêmica.

As raízes de *G. brasiliensis* estavam intensamente colonizadas em todas as áreas avaliadas, por estruturas do tipo micorrízicas ericóides, e endofíticas. Existem indicativos de que a mudança da composição da comunidade vegetal, pela introdução de planta exótica ou pela ação da queimada, assim como eventos climáticos afetam as estruturas de associação nas raízes capilares de *G. brasiliensis*. Os padrões de colonização, a morfologia do complexo das hifas e a estrutura das células epidérmicas apresentam considerável variação.

Observações de campo combinadas com isolamentos de fungos de plantas coletadas em campo, identificação e estudos de reinoculação em outros genótipos de *G. brasiliensis*, e outras espécies de Ericaceae são necessárias para determinar toda a gama de detalhes estruturais em micorrizas ericóides. Pesquisas relacionando estruturas de associação fungo-planta com metagenômica, podem revelar a complexidade que envolve as estruturas de associação com a taxonomia fúngica.

CAPÍTULO 3

FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A RAÍZES DE *Gaylussacia brasiliensis* (ERICACEAE) EM RESTINGA DO SUL DO BRASIL

RESUMO

A pesquisa em raízes de *Gaylussacia brasiliensis* representa uma oportunidade para obter importantes subsídios e informações sobre a ecologia da simbiose entre fungos e plantas. A hiperdiversidade, taxonomia fúngica e a complexidade dessas relações são grandes desafios para a ciência. Uma gama de fungos endofíticos ericóides é passível de isolamento e cultivo, o que possibilita a correlação da estrutura morfológica dos fungos, suas funções e informações genéticas. A abordagem baseada em traços funcionais possui aplicabilidade neste campo e as possibilidades metodológicas são diversas. O objetivo do presente estudo foi investigar fungos isolados das raízes de *G. brasiliensis*, avaliar as características estruturais desta associação, relacionar aspectos morfológicos como indicativos de estilo de vida e/ou funções ecológicas. Para isso foram realizados isolamentos de fungos a partir de raízes 80 plantas de vegetação de Restinga. Alguns fungos foram testados quanto à capacidade de formar associação endofítica, realizando inoculação, reisolamento e observação das interfaces de estruturas de associação em raízes das plantas inoculadas. Foram isolados mais de 200 fungos mostrando ampla diversidade, que pertencem às ordens Eurotiales, Charothyriales, Pleosporales, Diaporthales, Sordariales e Hypocreales. Esses fungos apresentam traços cujas principais funções são resistência, proteção e dispersão. Foram obtidos indícios da relação entre as estruturas fúngicas *in vitro* e a expressão nas interfaces de colonização. As estruturas de associação nas células radiculares se mostraram diversificadas, o que é possivelmente ocasionado pela quantidade de espécies de fungos envolvidos, mas também pela plasticidade morfológica dos fungos. Tais características tornam complexa a classificação, por morfologia e taxonomia, das relações de fungos endofíticos ericóides, e as interfaces de associação indicam a importante relação funcional desta comunidade fúngica.

Palavras-chave: Associação mutualística. Chaetomiaceae. *Diaporthe*, Morfologia. *Penicillium*. Traços funcionais.

3.1. INTRODUÇÃO

As plantas da família Ericaceae têm se revelado um nicho hiperdiverso de fungos endofíticos. As especializadas raízes capilares abrigam estruturas de associação do tipo micorrízicas ericóides (ErM) e ampla gama de fungos endofíticos (EF, DSE). Estas associações mutualísticas permitem que as ericáceas se estabeleçam em locais com solos ácidos, pobres em nutrientes, com componentes tóxicos e condições ambientais severas (MITCHELL; GIBSON, 2006). Os fungos mutualistas fornecem habilidades nutricionais, com as quais os organismos simbiossiontes podem ter acesso a fontes orgânicas recalcitrantes, além de atuarem como um tampão em situações de estresse (BENDING; READ, 1996; FUKUCHI; OBASE, 2011; LEAKE; MILES, 1996; LEAKE; SHAW; READ, 1989; READ, 1996).

O estudo da interação-fungo planta em ericáceas representa oportunidade para avançar na compreensão de ecologia funcional e evolução das simbioses (LEOPOLD, 2016). Uma gama cada vez mais diversificada de fungos é reconhecida como simbiossiontes ericóides (LEOPOLD, 2016). A falta de dados taxonômicos e funcionais para a maioria dos fungos endofíticos ericóides, representam desafios significativos para a pesquisa.

No entanto, uma documentação abrangente sobre a diversidade de fungos endofíticos ericóides, só pode ser obtida através de amostragem contínua de diversos ecossistemas, pesquisas sobre ecologia e diversidade funcional destes fungos e da interação com a planta simbiossionte.

Embora grande parte dos estudos em associação mutualística em Ericaceae, foque na tentativa de delineamento de taxas formadoras de estrutura “micorrízica ericóides”, tentando separar estes da comunidade fúngica mais ampla associada a estas plantas (LEOPOLD, 2016). A verdadeira diversidade de fungos endofíticos ericóides permanece por ser resolvido. A pesquisa permanece estagnada em poucos táxons fúngicos, e experimentos de ressíntese mostram expressões de estrutura de associação diversificada. Certamente isto também ocorre devido à amostragem limitada de algumas regiões, e desafios associados a lidar com a complexidade da hiperdiversidade.

Parte dos fungos endofíticos ericóides são facilmente isolados e cultivados em laboratório. E a abordagem de pesquisa baseada em isolamento, possibilita a correlação da estrutura e funções fúngicas às informações genéticas. Uma vez que, muita informação genética sobre fungos tem sido gerada a partir de amostras ambientais, sem ter correlação

com espécimes. E esta conexão entre dados moleculares e espécimes tem se mostrado altamente complexa (HIBBETT et al., 2016; SCHOCH et al., 2014). Sendo que, em se tratando de grupos mais desconhecidos, os dados moleculares não são suficientes para a classificação taxonômica.

Alguns fungos potencialmente mutualísticos que têm sido identificados em raízes de Ericaceae são: do filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Leotiomycetes, as ordens Helotiales, Leotiales, Rhytismatales; classe Eurotiomycetes, Chaetothyriales, Eurotiales, Onygenales; classe Pezizomycetes, Pezizales; classe Sordariomycetes, Xylariales, Chaetosphaeriales, Coniochaetales, Diaportales, Hypocreales, Magnaporthales, Sordariales; classe Dothideomycetes, Capnodiales, Pleosporales, Botryosphaeriales, Dothideales; do filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes, as ordens Agaricales, Russulales, Cantharellales, Sebaciniales, Phallales, Polyporales; classe Tremellomycetes, Tremellales; e do filo Mucoromycota as ordens Mucorales e Mortierellales (BERCH; ALLEN; BERBEE, 2002; BIZABANI; DAMES, 2015; BOUGOURE et al., 2007; BOUGOURE; CAIRNEY, 2005; BRUZONE et al., 2017; BRUZONE; FONTENLA; VOHNÍK, 2015; GORZELAK; HAMBLETON; MASSICOTTE, 2012; MIDGLEY; CHAMBERS; CAIRNEY, 2004; SHARPLES et al., 2000; TIAN et al., 2011; ZHANG et al., 2016)..

Em estudos envolvendo bioprospecção de fungos endofíticos, a taxonomia é um dos pontos críticos, principalmente devido à alta diversidade genética e morfológica. Sendo assim, é necessário utilizar métodos que viabilizem alguma sistematização. Para avaliação rápida da diversidade e para estudos ecológicos, envolvendo táxons não identificados de micro fungos, Arnold et al. (2000) estabeleceram critério de classificação dos isolados como morfoespécies, utilizando macro e micro morfologia.

Em frente a complexidade e dinâmica destas interações, a abordagem baseada em traços funcionais (*trait-based*), tem potencial de contemplar a funcionalidade das relações mutualísticas. Se baseia em utilizar dados micológicos tradicionais, originários de culturas e coleções. A observação de traços é uma ferramenta para a ampliação dos conhecimentos sobre a base funcional destas relações mutualísticas e para estudos das interações entre táxons fúngicos endofíticos e plantas hospedeiras (AGUILAR-TRIGUEROS et al., 2014).

Na abordagem baseada em traços funcionais devem ser observadas características ecologicamente relevantes. Identificando nestas critérios dos traços fúngicos passíveis de serem utilizados: (a) versatilidade

ecológica, devem ser representativos para inferir o uso de recursos pelos fungos, processos ecossistêmicos; (b) amplo espectro, devem ser relevantes para uma grande variedade de espécies fúngicas; e (c) mensurabilidade, os métodos devem ser concebidos para obter dados a partir de um conjunto de espécies usando protocolos padronizados (AGUILAR-TRIGUEROS et al., 2015).

Neste estudo o objetivo foi investigar a relação fungo-planta, avaliando as características estruturais destas associações e relacionar aspectos morfológicos como indicativos de estilo de vida e/ou funções ecológicas. Avaliar a formação de associações endofíticas nas raízes de *G. brasiliensis*, quando inoculados fungos isolados da mesma espécie.

Para tanto, foi realizado um *screening* de fungos endofíticos das raízes de *G. brasiliensis*. Os fungos isolados foram agrupados em padrões morfotípicos, relacionando a traços funcionais e avaliados por análises matemáticas. Foi realizada a identificação polifásica de algumas destas morfoespécies, combinando características morfológicas e amplificação do DNAr com os primers ITS1-ITS4 (White et al. 1990). A relação mutualística de *G. brasiliensis* com algumas morfoespécies foi verificada realizando inoculação, em plantas propagadas vegetativamente, em condições semi-controladas. Os critérios de avaliação foram o reisolamento e análise de características estruturais da associação nas raízes.

Temos a hipótese de que a comparação da capacidade de fungos endofíticos ericóides formarem estruturas de associação e a identificação por meio de sequenciamento dos fungos envolvidos pode ajudar a esclarecer a relação mutualística e demonstrar eventual relevância funcional das características morfológicas.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Coletas de campo e isolamento de fungos

O estudo foi conduzido com a formação de um acervo de fungos endofíticos ericóides, isolados de raízes de *G. brasiliensis* em vegetação de Restinga no Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, Florianópolis, Brasil (Lat. 27°37'48"S Long. 48°27'56"O e Lat. 27°36'33"S Long. 48°27'20"O). A autorização para a realização de atividades científicas foi concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO 46847-2), e prefeitura de Florianópolis (E068045/2014).

As coletas de raízes para isolamento dos fungos ocorreram nos verões de 2015 (janeiro, março e novembro) e 2016 (fevereiro). Raízes de dez plantas, de quatro áreas em dois momentos ($n = 80$ plantas; $n \cong 7,2$ m de raízes). As áreas de coleta se caracterizavam com diferentes composições de vegetação: A1N, com adensamento de plantas de camarinha e baixa ação antrópica; A1Q, em regeneração após queimada; A3N, com distribuição aleatória de plantas e pouca ação antrópica; A3P, com presença da invasora *Pinus* spp. (Figs. 18, 19; Tab. 5).

O procedimento para o isolamento aconteceu em até 24 horas após a coleta. Em câmara de fluxo laminar, segmentos de 1,0 cm de raízes capilares saudáveis foram lavadas com água destilada 3 vezes, mantidas em álcool 70% por 30 s, lavadas em ADE, NaCl 0,1% por 60 s, novamente em ADE, secas em papel filtro esterilizado, e então implantadas em placas de Petri (100 mm de diâmetro) com os meios de cultura Ágar Malte Levedura (AML), Ágar Rosa de Bengala de Martin (ARM) ou Melin-Norkrans Modificado (MNM), todos com estreptomicina ($0,03 \text{ g l}^{-1}$).

As placas foram incubadas a $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, no escuro por até 12 semanas (GORZELAK; HAMBLETTON; MASSICOTTE, 2012; LEAKE; READ, 1991; PEARSON; READ, 1973). A separação e isolamento das colônias ocorreram por observação das características macro morfológicas. Os micélios que se diferenciavam quando as colônias atingiam cerca de 1,0 cm de diâmetro eram transferidos para novo meio de cultura, mantendo-se três colônias da mesma morfoespécie nas placas de Petri. Foram isolados somente fungos com crescimento inferior a 1,0 mm por dia.

3.2.2. Caracterização de morfoespécies e morfotipos

As colônias de isolados foram definidas como morfoespécies, e os agrupamentos das colônias, por similaridade e diferença, foram definidos como morfotipos. As características morfológicas e culturais avaliadas foram a taxa de crescimento (aos 7 e 14 dias), textura, forma, topografia, bordas, aspecto, produção de exsudatos e difusão no meio e cores predominantes.

Foram avaliados 140 morfoespécies, compondo-se uma matriz utilizando dados semi-quantitativos, obtidos pela transformação das variáveis morfológicas aplicando padrões graduais (Apêndice C).

Foram selecionados 13 morfotipos, abrangendo 52 morfoespécies, categorizadas por observação de acordo com a similaridade. Os critérios

utilizados incluíram: frequência, produção de metabólitos secundários e estruturas de interesse.

Na análise fenotípica foi aplicado Cluster Aglomerativo Hierárquico (CAH) e Análise de Componentes Principais (PCA), utilizado o software XLSTAT versão 2016.5. Os grupos morfofípicos selecionados foram confrontados com as análises matemáticas para mapear características agrupadoras e indicadores de estilo de vida.

Nove morfoespécies, representante de morfotipo, foram analisadas microscopicamente, o tecido fúngico fresco foi transferido para lâminas, sendo parte corado com azul de anilina, e fixados em PVLG. Utilizou-se microscópio óptico Olympus BX40, e as estruturas foram registradas por fotografias digitais ou através de software de imagem Leica DM2500.

As características avaliadas foram baseadas nos critérios descritos na bibliografia (ALEXOPOULOS et al., 1996; ARX 1981; BARNETT; HANLIN 1989; ELLIS, 1971, 1976; HUNTER, 1987; BESSEY, 1950; KIRK et al., 2008; WATANABE et al., 2011).

3.2.3. Extração de DNA e PCR

A extração do DNA das morfoespécies Gb09, Gb47, Gb104, Gb209^o, Gb225, Gb260 e Gb261, foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Solos (MIP, UFSC).

Foi utilizado método adaptado de Möller et al. (1992). Os isolados foram incubados por sete dias em tubos falcon com 10 mL de meio líquido (malte 3%, levedura 3%, peptona 5%). Os tubos foram centrifugados, descartando-se o sobrenadante, e o micélio foi lavado adicionando 5 mL do tampão TES, alternando agitação em vórtice e submergidos em gelo. O precipitado de massa micelial foi acrescido de igual volume de pérolas de cerâmica esterilizadas e a mistura coberta com o tampão TES. Os tubos foram deixados a -20 °C por 30 min, agitados em vórtice alternando-se com submersão em gelo. Foi acrescentado 5,7 µL de proteinase K e o material foi e incubado a 55 °C por 30 min. A seguir foi acrescentado 120 µL de cloreto de sódio 5 M, 250 µL de CTAB 10% com incubação a 65 °C por 60 min. Novamente os tubos foram, agitados em vórtice alternando-se com submersão em gelo.

Uma alíquota de 300 µL de material foi retirada de cada tubo e transferida para micro tubos de 1,5 mL. Adicionou-se 0de SEVAG. Após a incubação a 4 °C *overnight* os microtubos foram centrifugados e alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram transferidas para novos microtubos de 1,5 mL. Adicionou-se 110 µL de isopropanol e incubou-se

por 12 h a -20°C . Os microtubos foram centrifugados e o sobrenadante foi descartado e os pellets foram lavados com etanol 70% previamente acondicionado a -20°C . Os tubos secaram à temperatura ambiente em fluxo laminar e suspensos em MilliQ e preservados a -20°C . As amostras de DNA foram avaliadas quanto a quantidade e pureza em Nanodrop2000 (Thermo).

O DNA das morfoespécies Gb207 e Gb231 foi extraído pela empresa WEMSeq Biotecnologia. Aproximadamente 50 mg de tecido fúngico foram utilizadas para extração de DNA, com o kit UltraClean Tissue and Cells DNA Extraction kit (MoBio), conforme recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram avaliadas quanto a quantidade e à pureza em Nanodrop2000 (Thermo).

A amplificação e sequenciamento do DNAr foram realizadas pela empresa WEMSeq Biotecnologia. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti (Thermo), em reação contendo 20 ng de DNA genômico purificado com sistema GoTaq (Promega). Para a região ITS, foram utilizados 32 ciclos de desnaturação (96°C por 30 seg), anelamento do primers ITS1 5'-TCCGTXGGTCAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990) (58°C por 45 seg) e extensão do produto (72°C por 45 s). Os produtos foram analisados por eletroforese em agarose 1% (tampão TAE). As reações foram purificadas enzimaticamente com ExoI/SAP (Thermo), conforme recomendação do fabricante.

3.2.4. Sequenciamento Sanger e análise filogenética

Os produtos de PCR foram marcados com BigDye v3.1 (Thermo) conforme orientações do fabricante, em reação contendo 50 ng de DNA. Foram utilizados 35 ciclos de desnaturação (96°C por 15 s), anelamento do respectivo primer (ITS à 58°C por 15 s) e extensão do produto (60°C por 4 min) para marcação com terminadores fluorescentes. Os produtos marcados foram precipitados com 20% de acetato de amônio 7,5 M e três volumes de etanol absoluto, e re-suspensos em 10 μL de HiDi-formamida. Essas amostras foram sequenciadas em Genetic Analyser 3500xL (Thermo), utilizando capilares de 50 cm com polímero Pop7 (Thermo), conforme orientações do fabricante. Os eletroforetogramas gerados foram convertidos em sequência de bases com o programa Sequencing Analysis v5.4 (Thermo).

Os dados obtidos foram analisados e editados manualmente no programa Bioedit 7.2.5 (HALL, 1999) para gerar as sequencias consenso

(*contig*). Para afiliação filogenética os *contigs* obtidos, foram comparadas com sequências do Genbank pelo programa online BLAST (ALTSCHUL et al., 1997; NCBI, 1988), as sequências encontradas foram baixadas no formato *fasta*. O alinhamento das sequências foi feito por meio da ferramenta on-line MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) (LI et al., 2015).

3.2.5. Experimento de colonização endofítica

Para análise da relação de oito fungos isolados com *G. brasiliensis* foi realizado experimento em casa de vegetação, que consistiu em inoculação, avaliação de colonização e reisolamento. As plantas foram produzidas a partir de estacas vegetativas apicais de 10 cm. O material propagativo foi mantido em NaCl 0,5% por 15 min, lavadas com água destilada e mantidas por 10 min em AIB 2000. As estacas foram então enraizadas em substrato composto por solo originário das dunas e vermiculita (3: 1), autoclavado duas vezes a 121 °C, 1,2.kg^{cm}-2 por 60 min e colocados em tubetes de 280 cm³.

Os tratamentos de inoculação foram: controle negativo (substrato autoclavado, sem inoculação); controle positivo (substrato não autoclavado, sem inoculação); e os isolados Gb09; Gb47; Gb104; Gb207; Gb209; Gb225; Gb231; Gb260; Gb72 (não caracterizado neste estudo devido à grande variação morfológica que apresentou *in vitro*).

Os inóculos foram preparados a partir das colônias incubadas em AML por 14 dias, a 25 °C no escuro. A suspensão foi ajustada para a concentração de 1,5.10⁶.ml⁻¹ de estruturas reprodutivas (conídios + esporos + micélios), e 25 mL foi aplicada sobre o substrato 12 semanas após o plantio (MCKECHNIE; BURTON; MASSICOTTE, 2009).

As placas foram avaliadas qualitativa e quantitativamente, aos 14 e 21 dias de incubação. Verificando o número de morfotipos crescendo por placa e por segmento de raiz na placa.

Após 12 semanas de incubação foi realizado tentativas de reisolamentos dos fungos que se assemelhavam macro morfológicamente com as morfoespécies que haviam sido inoculados. Aplicando-se o procedimento descrito anteriormente para isolamento de “culturas puras” (item 3.2.1.). A separação e isolamento das colônias ocorreram por observação das características macro morfológicas. Os micélios que se diferenciavam quando as colônias atingiam cerca de 1,0 cm de diâmetro eram transferidos para novo meio de cultura, mantendo-se três colônias da mesma morfoespécie nas placas de Petri.

A avaliação da associação ocorreu pela avaliação da taxa de colonização de uma porção das raízes capilares, cinco plantas de cada tratamento. As raízes de cada planta foram organizadas em cassetes histológicos, clareadas com a solução composta por água destilada, hidróxido de amônio 28% e peróxido de hidrogênio 37%, (8:1:1) de 10 a 30 min em temperatura ambiente, com agitação suave, até que as raízes ficassem cor creme pálido. Foram então enxaguadas duas vezes em água destilada, acidificadas com HCl 1% por 5 min, e coradas com 0,05% de azul de anilina em lactoglicerol *overnight*.

Foram montadas lâminas com 5,0 cm segmentos de raízes em PVLG. Em cada lâmina foram analisados 100 campos em aumento de 400x (microscópio Olympus CX40), aplicando um índice de 0 a 4: 0 = nenhuma célula colonizada; 1 = até 25%; 2 = até 50%; 3 = até 75%; 4 = mais de 75%. Posteriormente os índices foram convertidos em percentagem para análise estatística, e aplicado o teste Shapiro-Wilk para verificar normalidade, e então os testes Kruskal-Wallis e Dunn para comparação de tratamentos.

Também foram documentadas características qualitativas das interfaces das associações. Observando-se padrões de colonização e estruturas fúngicas, microscópio óptico e fotos digitais. As observações foram realizadas nos Laboratório de Ecologia do Solo e Laboratório de Fisiologia Vegetal (ambos CCA- UFSC).

Para avaliação das interfaces foi também utilizada microscopia confocal a laser (MCL) em raízes frescas, coradas com lactofucsina 0,05% *overnight* a 47 °C, então as raízes foram armazenadas na solução água destilada: glicerol: ácido láctico a 85% (1:1:1) (KAMINSKYJ, 2008). As estruturas foram observadas em Microscópio Leica DMI600B, a faixa de fluorescência de excitação foi 543 nm (verde) e filtro de emissão na faixa de 600–739 nm (vermelho). A parede celular das raízes autofluoresceu com a linha de excitação 488 nm e filtro de emissão 500–570 nm (verde). O programa Lite LAS-AF (Leica) foi usado para o processamento das imagens confocais. Todas as imagens de MCL foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC).

3.2.6. Forma de transmissão

Para testar a transmissão vertical de endofíticos foram incubadas sementes de *G. brasiliensis*. O procedimento foi o mesmo realizado para as raízes (item 3.2.1). As sementes foram lavadas com água destilada 3

vezes, mantidas em álcool 70% por 30 s, lavadas em ADE, NaCl 0,1% por 60 s, novamente em ADE, secas em papel filtro esterilizado. Foram colocadas quatro sementes em três placas com cada um dos três meios de cultura AML, ARM e MNM, com estreptomomicina ($0,03 \text{ g. l}^{-1}$).

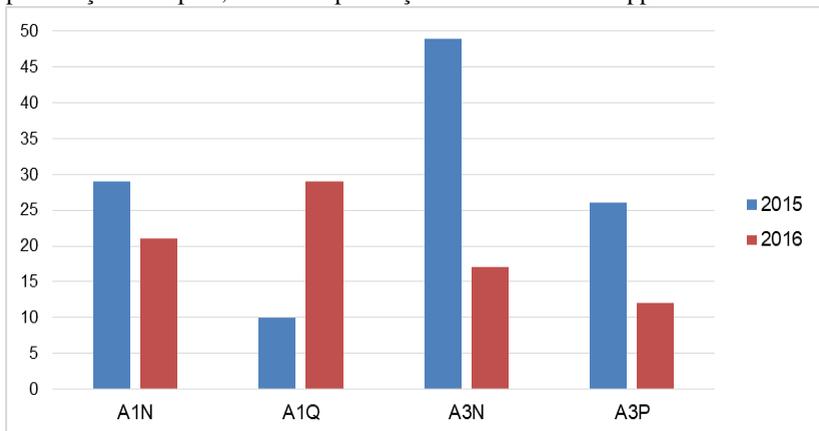
Para a transmissão horizontal foram utilizadas secções transversais de aproximadamente 1,00 mm de *lignotuber*. Foram colocados quatro fragmentos de *lignotuber* em cada placa, com três repetições para cada um dos três meios de cultura AML, ARM e MNM. Foi realizado o mesmo procedimento com pedaços de caule não lignificado. A desinfecção e incubação do material foi realizado utilizando o mesmo procedimento descrito para o isolamento a partir das raízes (item 3.2.1). Todas as placas ficaram incubadas no escuro a 25 °C por até 12 semanas. Exemplares dos fungos mais frequentes foram isolados e conservados a 4 °C.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Caracterização dos morfotipos

Foram isoladas mais de 177 colônias de fungos das raízes de *Gaylussacia brasiliensis*. O número de colônias por área foi: 53 em A1N; 45 em A3N; 39 em AP3; e 40 em A1Q (Fig. 29).

Figura 29 - Número de fungos isolados de raízes de *Gaylussacia brasiliensis*, no Parque Municipal da Lagoa da Conceição, Florianópolis. Quatro áreas de coleta de raízes em 2 anos. A1N com adensamento de plantas e baixa ação antrópica; A1Q regeneração após queimada; A3N com distribuição aleatória de plantas e pouca ação antrópica; A3P com presença da invasora *Pinus* spp.



A análise fenotípica, foi baseada em nove características macro morfológicas crescimento aos 7 dias, cor, forma, textura, superfície, borda, topografia, aspecto e difusão de exsudato para o meio de cultura. Por observação foram delimitados e selecionados 13 morfotipos (MT), que englobaram 52 das 177 morfoespécies (Tab. 09).

Os morfotipos MT1 e MT2 apresentaram maior frequência de isolamento, mais que 10 morfoespécies. MT3, MT4, MT5, MT6 e MT7 apareceram em frequência média, entre 7 e 5 representantes de cada morfoespécie. Enquanto que nos morfotipo MT8, MT9, MT10, MT11, MT12, MT13 foram isolados apenas um representante de cada.

Tabela 1 - Grupos morfotípicos, variáveis macro morfológicas: crescimento aos 14 dias em malte (média e desvio padrão). Forma - For (C circular, R rizoide, I irregular); Textura - Tex (al = algodonosa, av = aveludada, me = membranosa, gr = granulosa, pu = pulverulenta); Superfície - Sup (li = lisa, ca = camada, fis = fissurada, ru = rugosa); Borda - Bor (re = regular, fil = filiforme, ra = radiada, lo = lobada, ir = irregular); Topografia - Top (pl = plana, el = elevada, pr = pregueada, ap = apiculada); Aspecto = Asp (op = opaco, br = brilhante, um = úmido); Pigmentação do meio = Pig (A = ausente; P = presente).

Morfotipo	Crescimento 7 dias (mm)	Cores	For	Tex	Sup	Bor	Top	Asp	Pig
MT1	6,81 (± 0,55)	branco	I; R	al	ru	ir	ap	op, um	A
MT2*	6,09 (± 0,98)	amarelo, salmão, laranja	C	av	ca	re, fil	el	op, um	P
MT3	6,88 (± 0,58)	branco, creme	C	av	li, fis	re, fil	el	op	A
MT4*	7,84 (± 1,10)	branco, creme	C	gr	puli, fis	re, ir	el	op, br	A
MT5*	7,66 (± 1,31)	rosa, lilás	I	me	li	fil	el	op	P
MT6	7,42 (± 0,39)	branco, cinza	C	al, av	li	fil	el, ap	op	A
MT7*	1,45 (± 0,18)	preto, cinza	C	av	ru, fis	re	ap	op	A
MT8*	8,98 (± 0,03)	creme	C	gr	ca	fil	el	op	P
MT9	4,40	branco	C	me, gr	li	fil	pl	op	A
MT10*	6,20	esverdeado	C	av, al	ca, li	fil	el	op	A
MT11	7,50	creme, cinza	C	me, av, gr	li, ca, fis	re, fil	el	op, um	A
MT 12*	8,00	preto, cinza	C	av, al	ru	fil	pr	op, um	A
MT 13*	76,0 (± 0,57)	esverdeado	C, I	av, pu,	li, ca	ir, lo	el, ap	br	P

*MTs com representantes identificadas e analisadas quanto a relação endofítica.

Quanto a origem, não se pode observar relação dos morfotipo com a área e ano. A origem das morfoespécies escolhidas como representante dos grupos são: MT2 = Gb207, A1Q (2016); MT4 = Gb09, A1N (2015); MT5 = Gb104, A3N (2015); MT7 = Gb225, A1N (2016); MT8 = Gb231, A1Q (2016); MT10 = Gb47, A3P (2015); MT11 = Gb72, A3N (2015); MT12 = Gb209, A1Q (2016); MT13 = Gb206, A1Q (2016).

A transformação dos dados da categorização fenotípica em dados semi-quantitativos graduais (Apêndice C), gerou uma matriz que permitiu a aplicação das análises matemáticas.

Quando a matriz foi submetida a Análise dos Componentes Principais – PCA, verificou-se que, a distribuição das colônias coincide com dos alguns morfotipos pré-estabelecidos (Fig. 30). Na PCA foram identificadas características agrupadoras, indicadas pelo posicionamento nos eixos do gráfico PCA. Estas características foram relacionadas a traços funcionais e atribuídas a indicadores de estratégia e estilo de vida.

A variável superfície, no MT1, está relacionada à característica granulosa, que morfológicamente pareceu composta por colônias formadora de escleródios, relacionados principalmente a resistência.

Nos integrantes do MT2, a característica agrupadora foi a formação de corpos de frutificação tipo peritécio superficiais, relacionados a dispersão. Uma característica agrupadora no MT2, MT5 e MT8 foi a pigmentação do meio de cultura, relacionada a produção e difusão de metabólitos secundários.

No MT4, o aspecto pulverulento nessas colônias, se relacionou com a formação de corpo de frutificação tipo cleistotécio, indicador de resistência e dispersão.

No MT6 as características agrupadoras foram micélios escuros e crescimento lento, indicando pouco investimento em massa micelial. A melanização de tecidos está ligada a proteção.

Na análise de Cluster Hierárquico Aglomerativo – CAH, a matriz gerou um dendrograma fenotípico indicando 20 agrupamentos ao nível de similaridade de 0,89 (Fig. 31).

No confronto com os morfotipos pré-estabelecidos por observação da morfologia (Tab. 9), foram identificados agrupamentos concordantes, no entanto, com os nódulos em diferentes níveis de similaridade.

Ficou evidenciada a hiperdiversidade de fungos, por meio da formação de muitos grupos únicos, indicados pelos “braços” do dendrograma (Fig. 31).

Figura 30 - Análise dos Componentes Principais (ACP), correlacionando fungos isolados e características morfológicas, representando as observações (140 colônias) e as variáveis (10 características macro morfológicas). No eixo F1 as observações/ colônias estão distribuídas em agrupamentos correlacionados com a cor, taxa de crescimento e textura, sendo que as colônias com coloração escura (melanina) e de crescimento lento estão na parte negativa do eixo, explicando 24,87 % da distribuição. No eixo F2 está correlacionado com a presença de pigmentação no meio de cultura (metabólito secundário), localiza as colônias na parte negativa do eixo; forma, textura e topografia parecem ser os componentes agrupadores na parte positiva do eixo que explica 16,79 da distribuição. O confronto com a modelagem por observação está indicando morfotipos circulado em azul, circulado em vermelho estão os representantes dos morfotipos.

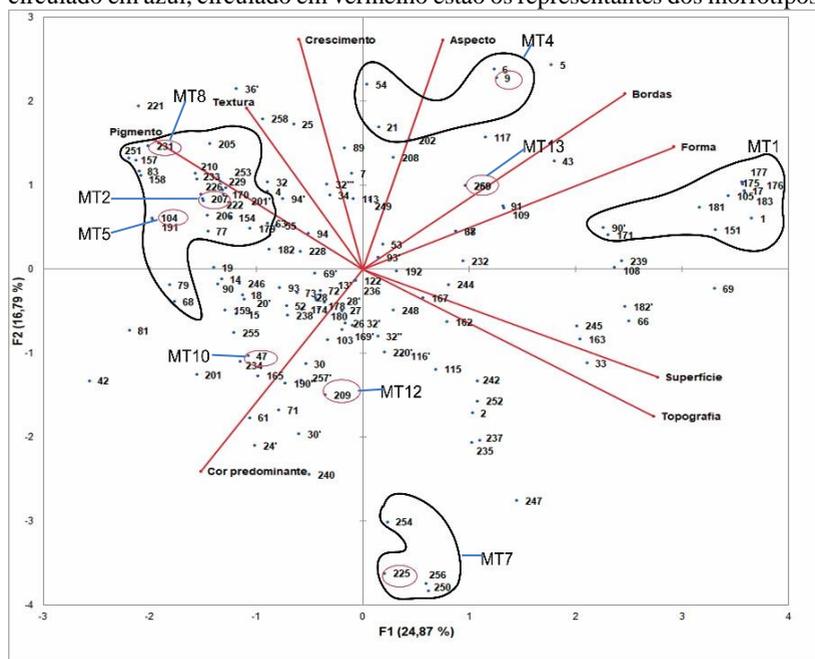
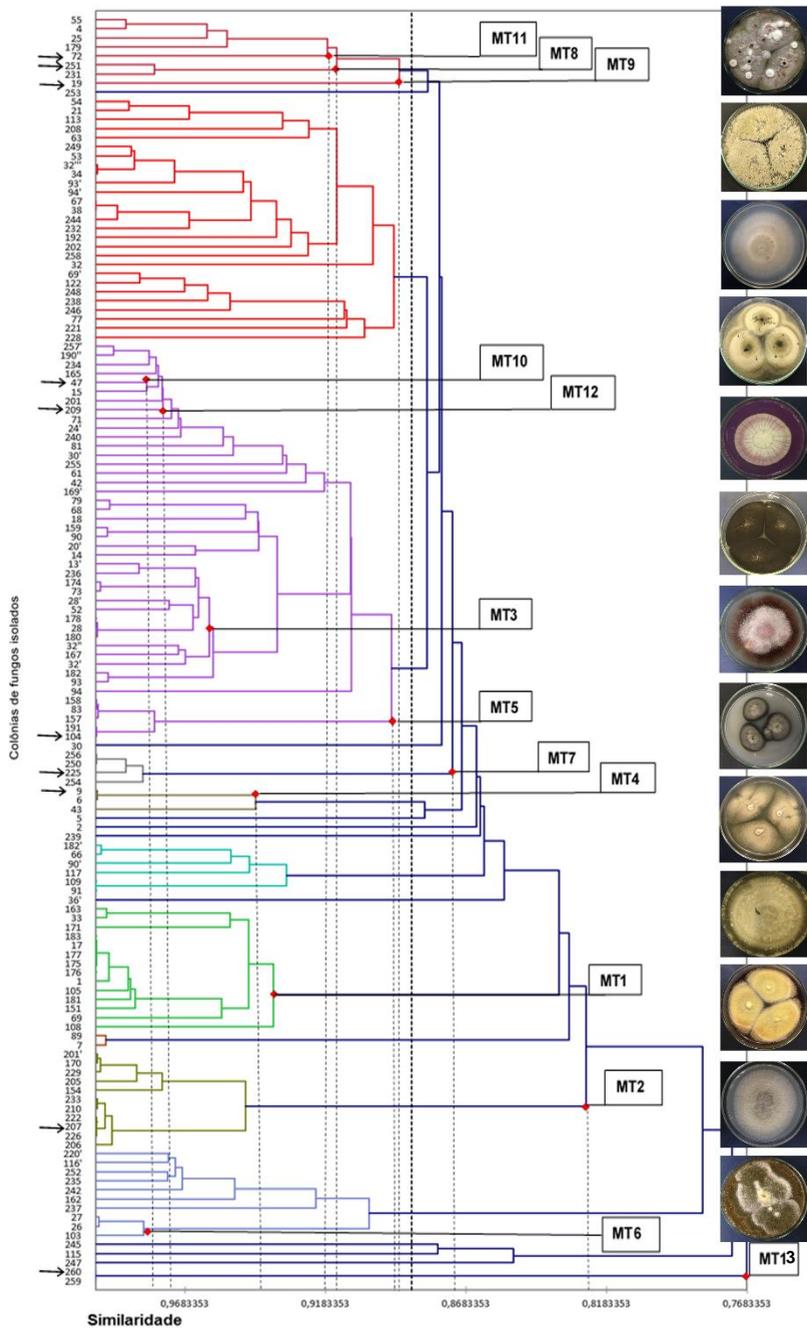


Figura 31 - Dendrograma da Análise de Cluster Aglomerativa Hierárquica (CAH) de 140 colônias de fungos isolados de raízes de *Gaylussacia brasiliensis*, gerado a partir de uma matriz composta por variáveis macro morfológicas e culturais agrupadas por similaridade utilizando coeficiente de correlação de Pearson e método de ligação simples. No índice de similaridade 0,89 são observados 20 agrupamentos. As setas indicam as colônias representantes dos morfotipos selecionados para análise. Losango vermelho indica os nós e as linhas tracejadas o nível de similaridade quando confrontados com a modelagem por observação. (Próxima página)



3.3.2. Taxonomia polifásica

A identificação taxonômica polifásica das morfoespécies permitiu chegar a nível de gênero (com ressalvas). Levou em conta a análise molecular (Tab. 10; Apêndice D), ponderando os dados de similaridade das sequências obtidos no Genbank, a hipótese de espécies (SH) do UNITE (*Unified system for the DNA based fungal species linked to the classification Ver. 7.2*), e sugerindo hipóteses taxonômicas com base em aspectos fenotípicos macro e micro morfológicos.

Tabela 2 - Identificação das morfoespécies, organizadas por classe, apresentando a hipótese taxonômica baseada no sequenciamento e avaliação morfológica dos espécimes. Similaridade com referência depositada no GenBank, e SH (*species hypothesis*) do UNITE com as referências do GenBank.

Todos foram isolados das raízes, exceto Gb261L isolado do *lignotuber*.

Classe	Morfo-espécie	PB	Hipótese taxonômica polifásica	Referência GenBank	Similaridade	UNITE SH / Ref. GenBank
Dothideomycetes	Gb47	534	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	FJ232902 <i>Microsphaeropsis arundinis</i>	99,44%	SH186929.07FU / AY642530.1 <i>Paraconiothyrium estuarinum</i>
	Gb209'	546	<i>Curvularia</i> species complex <i>Cochliobolus</i> sp.	KF946043 <i>Cochliobolus geniculatus</i>	100%	SH187563.07FU / JN192379 <i>Curvularia heteropogonis</i>
Euriptomycetes	Gb09	373	<i>Penicillium</i> species complex <i>Penicillium</i> sp.	U18358 <i>Penicillium javanicum</i>	99,46%	SH182481.07FU / JN626097 <i>Penicillium levitum</i>
	Gb225	493	<i>Cladophialophora</i> sp.	KX499283 Herpotrichiellaceae	97,60%	SH642976.07FU / AB986420 96,75% <i>Cladophialophora</i> sp.
Sordariomycetes	Gb104	485	<i>Fusarium</i> sp.	MF992182 <i>Fusarium oxysporum</i>	100%	SH213620.07FU / AB587010 <i>Fusarium verticillioides</i>
	Gb231	451	<i>Diaporthe</i> sp.	GU066691 <i>Phomopsis</i>	98,67%	SH185493.07FU / JX862528 <i>Diaporthe fraxini-angustifoliae</i>
	Gb260	406	<i>Chaetomium globosum</i> species complex	HM776417 <i>Chaetomium globosum</i>	100%	SH195293.07FU HM365253 <i>Chaetomium grande</i>
	Gb207	478	<i>Arcopilus</i> sp.	KU597364.1 <i>Chaetomium aureum</i>	100%	SH195302.07FU / KC131340 <i>Chaetomium aureum</i>
	Gb261L	497	<i>Arcopilus</i> sp.	KX976582 Chaetomiaceae	99,8%	SH195302.07FU / KC131340 <i>Chaetomium aureum</i>

A caracterização molecular e aspectos morfológicos foram complementares. A região ITS é bastante conservada e nem sempre é eficiente para obter um nível satisfatório de especificidade na identificação. As características morfológicas sozinhas não são suficientes para classificação, em função da complexidade e imensa diversidade morfológica, e desconhecimento da maior parte dos microfungos.

As informações sobre aspectos reprodutivos, foram também utilizadas na identificação das morfoespécies. As oito morfoespécies representantes de morfotipos, foram caracterizadas quanto tipos de conidioma ou ascoma, tamanho de esporos e investimento em esporos e micélios, buscando analisar as estratégias de dispersão (Tab. 11).

Tabela 3 - Características reprodutivas de onze fungos endofíticos isolados de raízes de *Gaylussacia brasiliensis*. Identificação da morfoespécie, fase reprodutiva observada (teleomórfica, anamórfica ou holomórfica), estrutura de formação de esporos (meióticos e mitóticos), caracterização dos esporos, investimento em esporos e estratégias de dispersão supostas.

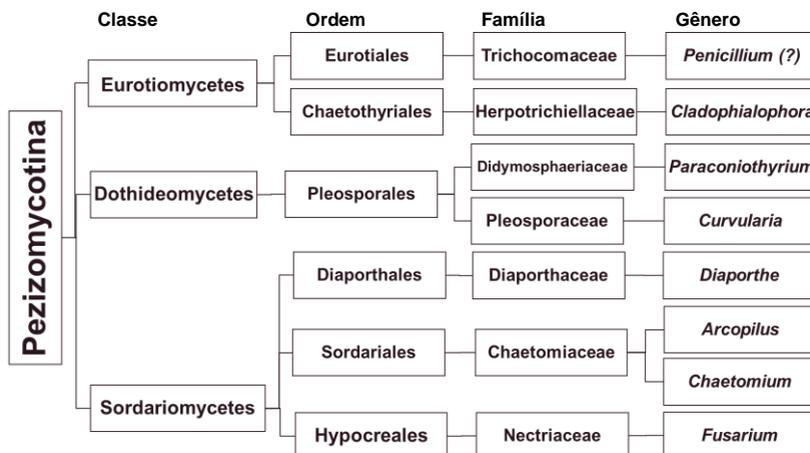
Morfo-espécie	Fase observada	Estrutura de formação e tipo de esporos	Esporos diâmetro (μm)	Investimento esporos	Investimento micélio	Estratégia de dispersão de esporos
Gb47	Anamórfica	Conidiomata - conídio	2,5-3,5× 0,7-1,8	+	++	Poucos em massa
Gb209	Anamórfica	Conidióforo - conídio	20-29,5× 9-14,5	+++	+++	Numerosos Precocidade
Gb09	Holomórfica	Cleistotécio - ascósporo	9,0-8,0× 5,0-4,0	+++	++	Resistência, numerosos tempo/espaço
Gb225	Anamórfica	Conidióforo - conídio	2,0-2,5 5,0-11,0× 6,0-15,0	+	+	Meristemático
Gb104	Anamórfica	Conidióforo - micro e macroconídio	1,0-2,0 4,0-7,0	++	++	Em massa
Gb231	Holomórfica	Estromata - ascósporo	18,0-28,0× 7,0-10,0	+	+++	Poucos
		Conidiomata - conídio	3,0-4,5× 1,7-2,0	?		
Gb207	Teleomórfica	Peritécio - ascósporo	8,0-10,0× 4,0-6,0	+++	++	Numerosos resistência
GB260	Holomórfica	Peritécio - ascósporo	7,3-10,1× 4,8-7,3	+++	++	Numerosos, forma eficiente
		Conidióforo - conídio	2,0-3,5	+		

Os representantes dos morfotipos pertencem ao filo Ascomycota, Pezizomycotina, sendo dois representantes da classe Eurotiomycetes, dois Dothideomycetes e quatro Sordariomycetes (Fig. 32).

A seguir estão descritas as oito morfoespécies estudadas. A maior parte das observações são baseadas em cultivos *in vitro*, em meio Ágar

Malte Levedura (AML), incubados a 25 (\pm 3) °C no escuro, quando houverem exceções serão citadas.

Figura 32 - Classificação dos fungos endofíticos das raízes de *Gaylussacia brasiliensis* avaliados. Pertencentes ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina. Foi representado por três classes, seis ordens, sete famílias e oito gêneros.

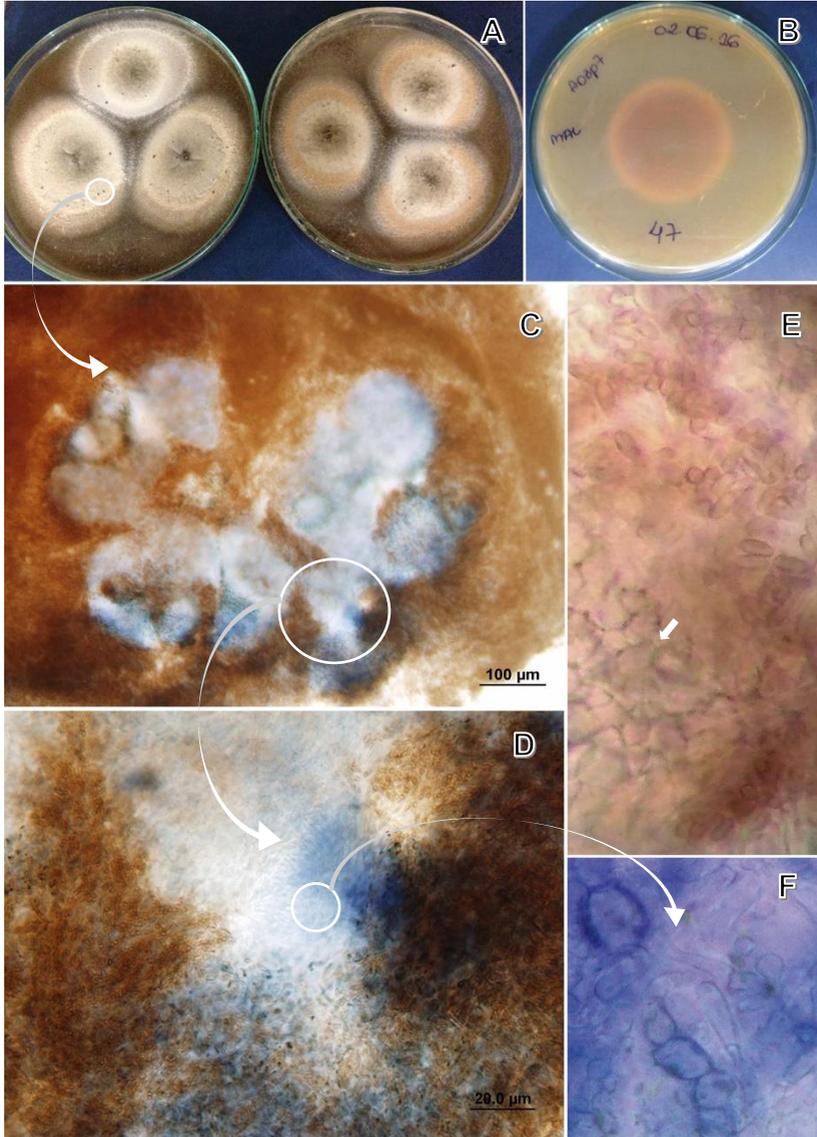


3.3.2.1. Dothideomycetes

A morfoespécie Gb47 (Fig. 33) foi identificada como *Paraconiothyrium* sp. (Pleosporales, Didymosphaeriaceae). Descrição: diâmetro da colônia (7 d, mm): AML 54; ARM 40. Em AML colônia com textura aveludada, cores creme, cinza claro a esverdeado, verso marrom claro (Fig. 33A, 33B).

Fase anamórfica observada, com conidioma tipo picnídio complexo com várias cavidades mescladas (Fig. 33C), ostíolos ausentes, superficial ou imerso no ágar, marrom escuro a preto com 0,7-1,2 mm diam. Parede conidiomatal composta por uma camada externa de textura angular com paredes espessadas e castanhas (Fig. 33F). Células conidiogênicas discretas, simples, holoblástica. Conídio com forma subglobosa a elipsoide, unicelular, com paredes finas e lisas que são hialinas quando se desprendem, mas logo se tornam laranja a marrom, com 2,5-3,5×0,7-1,8 μ m diam, massa de conídios marrom escuro. Sistema trimítico de hifas, generativas e esqueléticas hialinas e de ligação pigmentadas (melanizadas). A estirpe de referência no Genbank, com maior similaridade (Tab. 10) está publicada por Verkley et al. (2004).

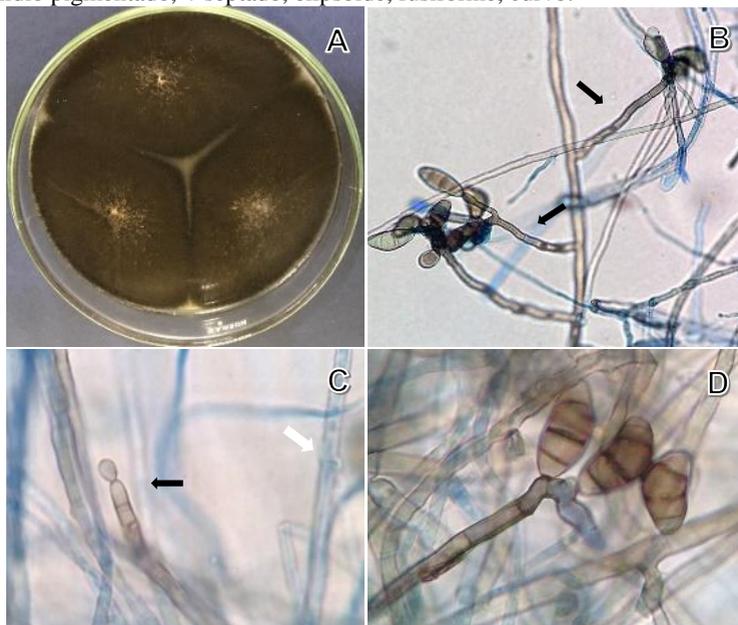
Figura 33 - Morfoespécie Gb47, *Paraconiothyrium* sp. em meio Ágar Malte Levedura (AML, 25 °C no escuro). (A) cultivos com 60 dias, placa da esquerda isolado do campo, placa da direita reisolado do experimento; (B) verso de cultivo com 28 dias; (C) conidiomata tipo picnídio complexo (com azul de anilina); (D) cavidade do picnídio com numerosos conídios; (E) parede conidiomatal com textura angular (seta) e conídios, (F) detalhe de células conidiogênicas e conídios.



A morfoespécie Gb209' (Fig. 34) pertence ao complexo de espécies *Curvularia* (Pleosporales, Pleosporaceae). Descrição: diâmetro da colônia (7 d, mm): AML 54-74; ARM 37-44; MNM 90. Colônia com crescimento circular, textura aveludada, superfície lisa, borda filiforme, topografia plana, com hifas submersas, cores cinza escuro a preto (Fig. 34A). Fungo anamorfo, com hifas melanizadas, septadas; conidióforo reto, septado, não ramificado, liso, castanho (Fig. 34B), célula conidiogênica politrética, intercalar, integrada, terminal, simpodial, cilíndrica, com cicatriz (Fig. 34C); conídio solitário, 4-septado, elipsóide, fusiforme, curvo, célula mediana castanha, células das extremidades castanho-claras, medindo $20-29,5 \times 9-14,5 \mu\text{m}$ (Fig. 34D). Em meio de cultura esporula precocemente, conídios maduros foram observados no terceiro dia de incubação. A estirpe de referência foi depositada no GenBank por Manamgoda et al. (2011).

No momento da inoculação havia outro fungo na cultura, possivelmente um Basidiomycota com conexão de grampo (Fig. 34C).

Figura 34 - Morfoespécie Gb209', *Curvularia* sp. em meio ágar malte levedura (AML, 25 °C no escuro). (A) colônia com 15 dias; (B) conidióforos com conídios (setas pretas); (C) Células conidiogênicas com início de formação de conídio (seta preta). Conexão de grampo de outro fungo presente na cultura (seta branca); (D) conídio pigmentado, 4-septado, elipsóide, fusiforme, curvo.



3.3.2.2. Eurptiomycetes

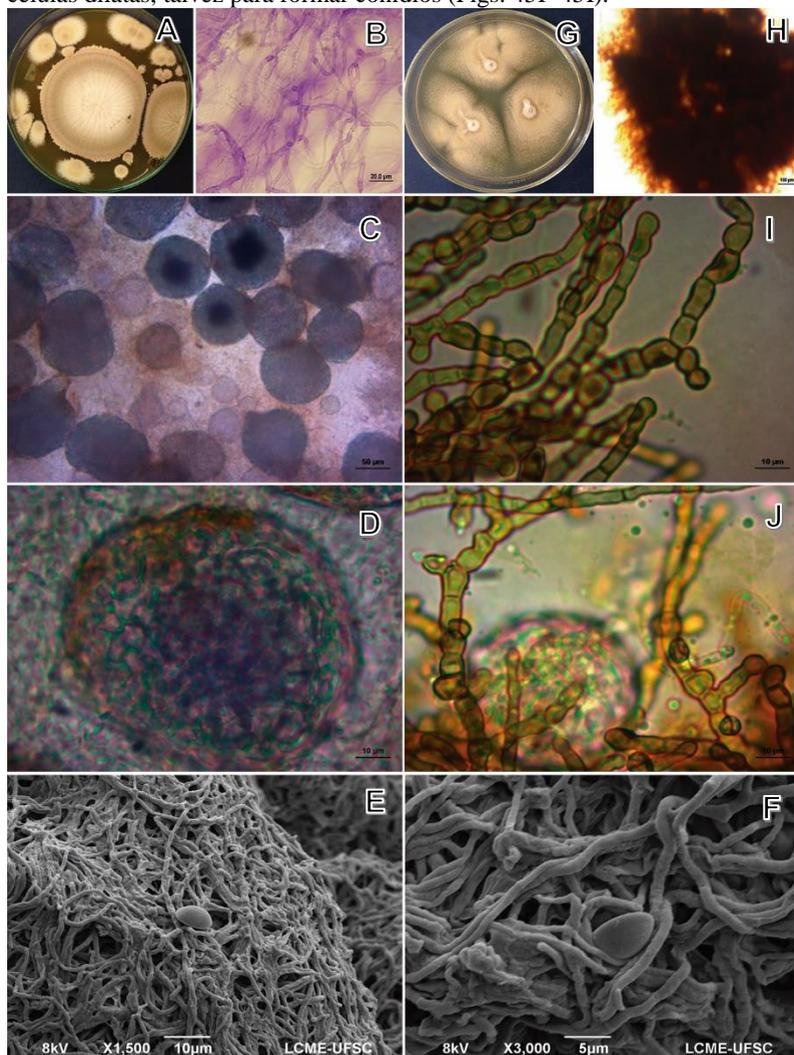
A morfoespécie Gb09 (Fig. 35) foi identificada como *Penicillium* sp. (Eurotiales, Trichocomaceae). Descrição: diâmetro da colônia (7 d, mm): AML 64 - 79; ARM 40 - 43; MNM 64 - 84. Colônia com forma circular, as vezes irregular, margem lobada regular, textura aveludada a pulverulenta. Inicialmente branca a bege influenciada pelo amadurecimento dos cleistotécios. Hifas hialinas, micélio discreto, gotas de exsudato claro, pigmentos solúveis ausentes (Fig. 35A, 35G), verso amarelo-castanho. Fungo holomorfo, produzido cleistotécios abundantemente a partir da primeira semana de incubação (Fig. 35C). Cleistotécio globoso, com diâmetro entre 140 - 85 μm , constituído por massas esclerotioides de células poligonais (35D), ascos globosos esvanecentes (35D), que produzem ascósporos subglobosos navicular com 8,0 - 9,0 \times 4,0 - 5,0 μm diam, (35E, 35F).

Produção de conídios esparsa, talvez conidiogênese blástica em fiáldes, conídio globoso, 2,0 - 2,5 μm diam. A ausência ou não clareza sobre a presença de conidióforos fialídicos, faz com que haja dúvida em relação ao pertencimento desse isolado ao gênero *Penicillium*, principalmente pela estrutura mostrada nas figuras 35I e 35J. Estas estruturas foram visualizadas *in vitro*, onde ficou clara a natureza conidiogênica, que produzem esporos mitóticos por conidiogênese holoblástica e na colonização das raízes (45D e 45E). Pode ser que estas hifas dilatadas também tenham outras funções, como parece estar ocorrendo “*mating*” na figura 35J, mas isso precisa ser melhor avaliado.

Os ascósporos parecem ser liberados por meio de “poros” na superfície esclerenquimatosa do cleistotécio (Fig. 35E, 35F). O cleistotécio permanece viável por mais de 12 semanas. A identificação deste fungo precisa ser realizada por sequenciamento utilizando *primers* específicos, provavelmente β -tubulina. A estirpe de referência do GenBank está publicada por Rivera e Seifertkeith (2011).

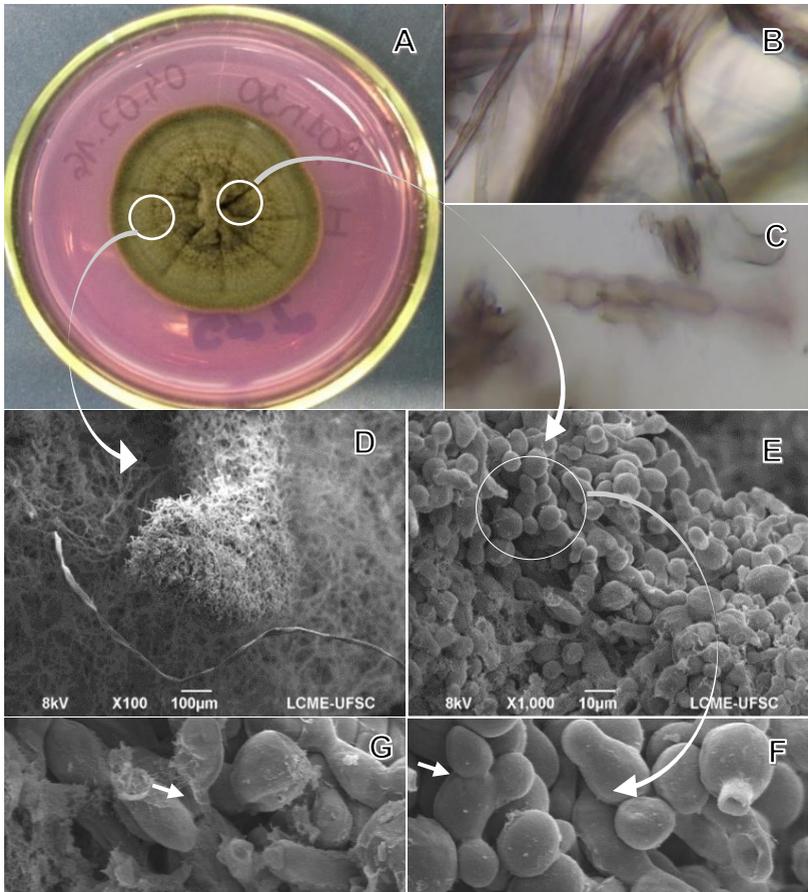
A morfoespécie Gb225 (Fig. 36) foi identificada como *Cladophialophora* sp. (Chaetothyriales, Herpotrichielliales). Descrição: diâmetro da colônia (7 d, mm): AML 10; ARM 14; MNM 14. Colônias com crescimento moderado, com taxa diária de crescimento de 0,11 \pm 0,01 mm por dia (25 °C no escuro). Colônias aveludadas, rugosa e pulverulenta quando esporulante, cinza escuro a oliváceo com margem bem definida que é mais escura do que o centro da colônia (Fig. 36A), verso oliváceo-cinza. Fungo anamorfo, com hifas septadas de 1,7 - 2,8 μm diam, férteis, que formam conídios lateralmente ou terminalmente em

Figura 35 - Morfoespécie Gb09, *Penicillium* sp. (?), (A) cultivado em Ágar Malte Levedura (AML) com 15 dias. Imagens em microscopia óptica MO (B, C, D); (B) sistema de hifas; (C) acomata tipo cleistotécio mostrando diferentes fases de maturação em 10 dias de incubação; (D) cleistotécio contendo ascos com 60 dias; (E, F) imagens em microscopia eletrônica de varredura, com 38 dias, ascósporos sendo liberado pelo cleistotécio através de “poros” um a um (setas brancas). (G) Colônia com 40 dias cultivada em Melin-Norkrans Modificado (MNM). (H) Em MO agrupamento de hifas diferenciadas tipo escleródio; (I, J) detalhe mostrando células dilatadas, talvez para formar conídios (Figs. 45F-45I).



em cadeias ramificadas (Figs. 36E-36G). Os conídios são unicelulares, sub-hialinos a marrom pálido, elipsoidais, piriformes, estreitado em as extremidades, com cicatrizes, $5,5 - 11,0 \times 6,0 - 15,0 \mu\text{m}$ diam. A estirpe de referência no GenBank está publicada por Obase et al. (2014).

Figura 36 - Morfoespécie Gb225, *Cladophialophora* sp., cultivada em meio Ágar Martin Rosa de Bengala (ARM, 25 °C no escuro); (A) 40 dias em placa de 60 mm, (B) hifas generativas; (C) cadeia de células conidiais; (D-F) microscopia eletrônica de varredura; (D) sistema de hifas agrupadas para formar conídios; (E) aglomerados de células conidiais leveduriformes; (F) detalhe de vesícula terminal dilatada que origina os conídios leveduriformes, três aumentaram para formar conídios, plugue septal na junção entre um conídio e uma célula subtendente (seta); (G) conídios maduros que se separam da região terminal de um ramo e diminuem abruptamente na extremidade proximal (seta).



3.3.2.3. Sordariomycetes

A morfoespécie Gb231 (Fig. 37) foi identificada como *Diaporthe* sp. (Diaporthales, Diaporthaceae). Descrição: Diâmetro da colônia (7 d, mm) em: AML 70 - 90; ARM 35 - 44. Crescimento circular, textura furfurácea, superfície rugosa, borda irregular, topografia elevada e aparência opaca. Coloração branco a bege, podendo ficar amarelada, verso castanho se tornando mais escuro a partir da terceira semana com pontos pretos (Figs. 37A-37C).

Este isolado possivelmente apresentou fase holomórfica, no entanto, as estruturas reprodutivas não puderam ser claramente analisadas. Observou-se a formação de conidioma picnidial em agregados de aproximadamente 1 mm de diâmetro (Figs. 37A, 37C, 37H), a partir da segunda semana em AML, mas não se observou conídios. Observou-se o que parece ser ou alongamento do peritécio “neck”, característico do gênero *Diaporthe* (37D-37G).

O micélio possui hifas aéreas adensadas, algumas hifas grossas formando estruturas que parecem clamidósporos (Fig. 37I). Anastomoses foram observadas com frequência (Fig. 37J). A estirpe de referência este publicada por Tan et al. (2013).

A morfoespécie Gb104 (Fig. 38) pertence ao gênero *Fusarium* (Hypocreales, Nectriaceae). Descrição: diâmetro da colônia (7 d, mm): AML 31 - 62; ARM 14 - 21; MNM 39 - 50. Em AML apresenta micélio aéreo bem desenvolvido, denso e algodonoso, com coloração variando de branco, levemente rosado, rosado a lilás (Fig. 38A). As hifas são fortemente unidas formando um tecido homogêneo com textura intrincada, sistema de hifas dimítico, generativas e esqueléticas (Figs. 38G, 38H).

Fungo anamorfo, com conidióforo produzindo macroconídios fusiformes curvos, alguns retos, hialinos, unicelulares, com extremidades arredondadas à levemente pontiagudo e com dimensão entre $4,0 - 7,0 \times 1,5 - 2,0 \mu\text{m}$, e microconídios globoso a subglobosos, alguns levemente curvados nas pontas com ápice arredondado e dimensão $1,0 - 2,0 \mu\text{m}$ (Figs. 38B, 38C, 38E-38H). Produz clamidósporos (Fig. 38C, 38D). A estirpe de referência este publicada por Watanebe et al. (2011).

A morfoespécie Gb207 (Fig. 39) foi identificada como *Arcopilus* sp. (sinon. *Chaetomium*) (Sordariales, Chaetomiaceae). Descrição: diâmetro da colônia (7 d, mm) em: AML 34 - 40; ARM 33 - 36; MNM 36 - 60. As colônias são amarelo a laranja (Figs. 39A, 39B) com gotas vermelhas por verter exsudados, verso castanho avermelhado. Sistema de hifas dimítico, hifas esqueléticas e generativas (Fig. 39J).

Figura 37 - Morfoespécie Gb231, *Diaporthe* sp. cultivado em Ágar Malte Levedura (AML, 25 °C no escuro); (A) 15 dias incubação; (B, C) com 21 dias, ante verso e verso respectivamente; (D-G) possível alongamento do peritécio, (D, F) com 15 dias em microscopia eletrônica de varredura (MEV); (E, G) com 30 dias em microscopia óptica (MO). (H) Massa estromática, possivelmente formando conidioma ou ascoma; (I) hifas, e clamidósporo (?) em MO corado com azul de anilina; (J) hifas com 7 dias mostrando anastomose em MEV.

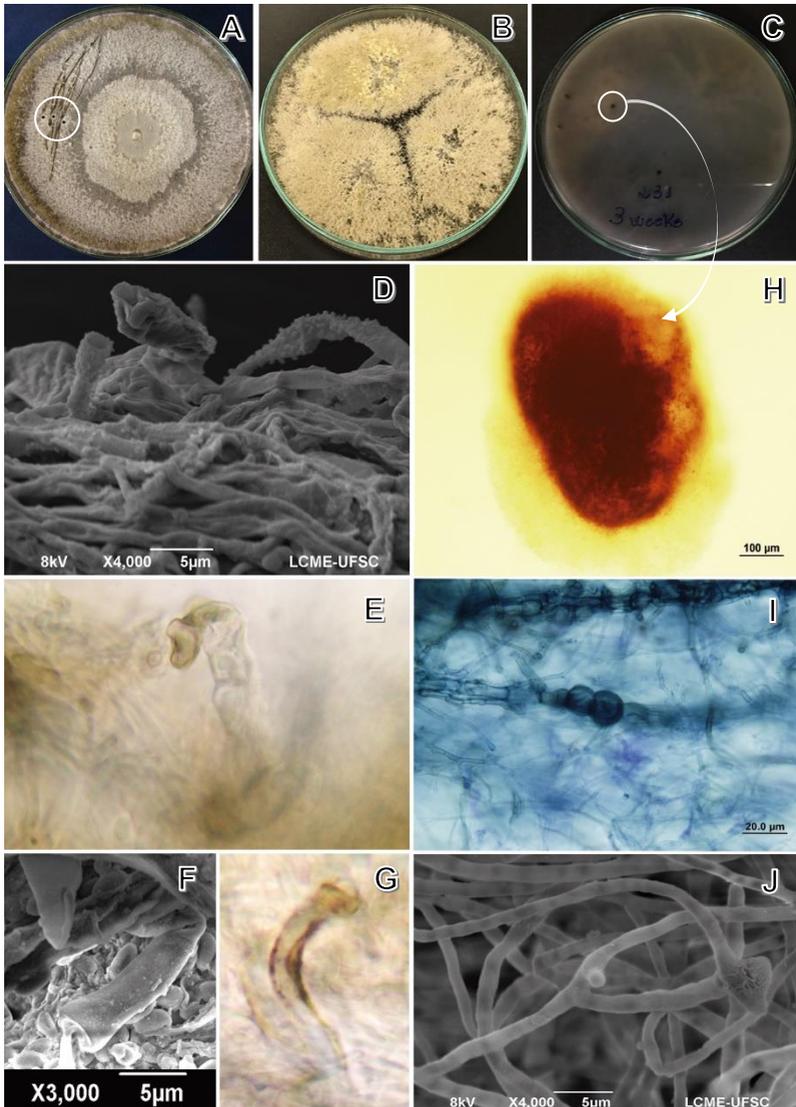
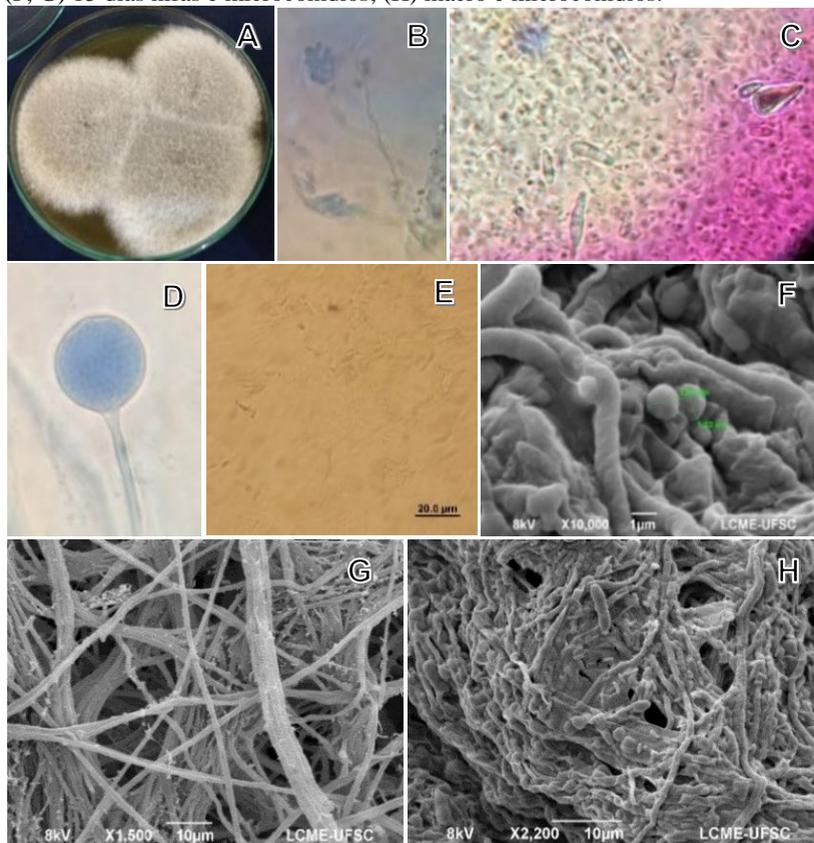
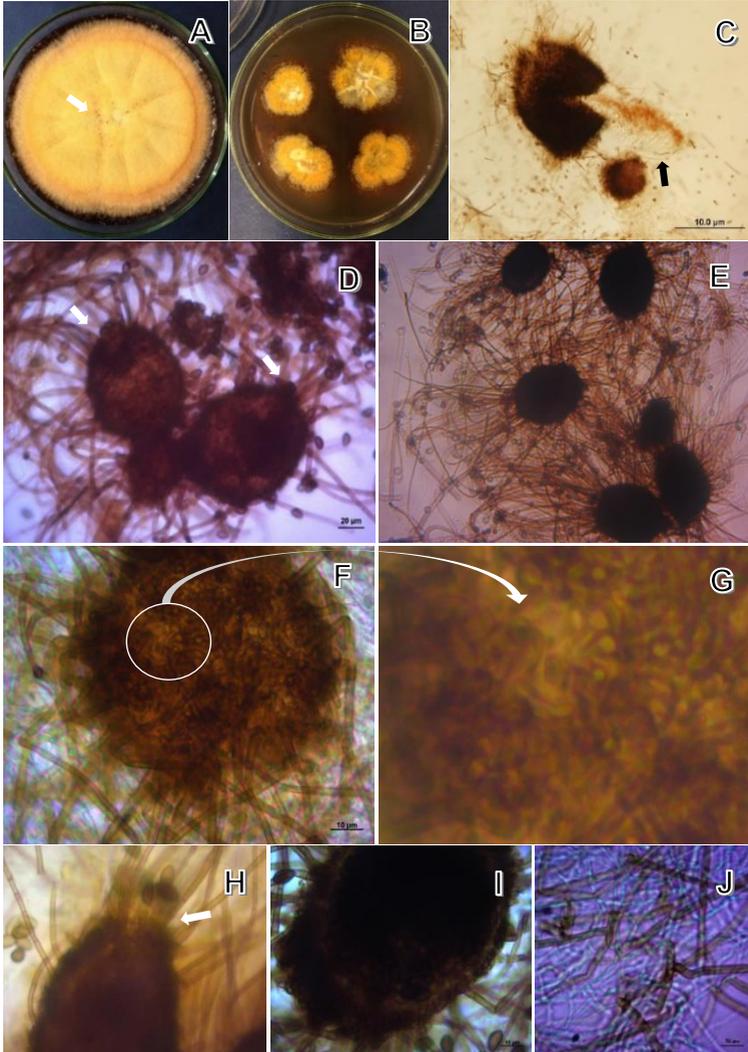


Figura 38 - Morfoespécie Gb104, *Fusarium* sp. cultivado em Ágar Malte Levedura (AML 25 °C no escuro). (A) Com 18 dias de incubação; (B-E) em microscopia óptica, (B) microconídeos, corado com azul de anilina; (C) macro e microconídios, e clamidósporo, corado com rosa de bengala; (D) clamidósporo, azul de anilina; (E) macroconídios; (F-H) microscopia eletrônica de varredura, (F, G) 15 dias hifas e microconídios; (H) macro e microconídios.



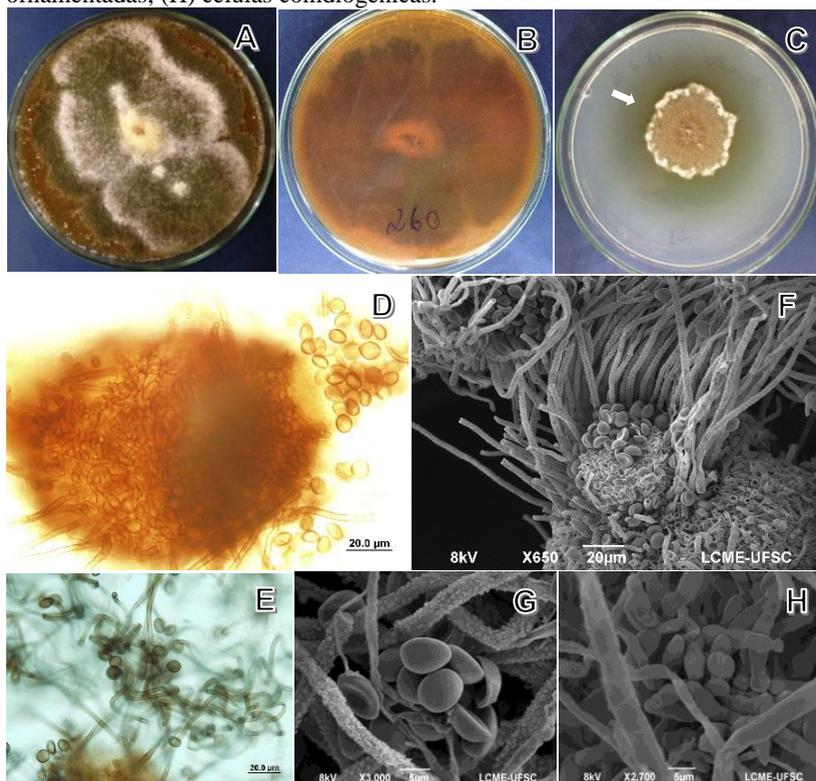
Acorpilus (Gb207) apresentou fase teleomórfica, produzindo ascomata superficial tipo peritécio, com diam 77,0 - 80,0 × 78,0 - 97,0 µm diam, setoso, ostiolado, subgloboso ou ovado com paredes marrons de textura angularis na superfície (Figs. 39F, 39G). Ascospores clavados evanescentes (Fig. 39C), formando ascósporos castanhos quando maduros, ovóides com 8,0 - 10,0 × 4,0 - 6,0 µm diam (Figs. 39D, 39H, 39I). A estirpe de referência não está publicada, mas Wang et al. (2016) sugeriram a classificação como gênero *Acorpilus* em vez de *Chaetomium*.

Figura 39 - Morfoespécie Gb207, *Arcopilus* sp. (A) colônia cultivada em meio Ágar Malte Levedura (AML, 25 °C no escuro), com 24 dias; (B) Em Melin-Norkrans Modificado, mostrando exsudato difuso no meio, 7 dias; (C) ascoma tipo peritécio (rompido artificialmente) mostrando ascos (seta) e ascósporos; (D) peritécio subgloboso liberando ascósporos pelo ostíolo (setas) 20 dias; (E-G) com 24 dias, (E) ascomata com setas flexíveis e curvadas; (F) ascomata com textura angularias e (G) no detalhe ascogênese; (H) peritécio com ostíolo liberando ascósporos, com 28 dias, (I) peritécio contendo ascósporos maduros, 50 dias; (H) sistema de hifas com 7 dias (corado com azul de anilina).



A morfoespécie Gb260 (Fig. 40) pertence ao complexo de espécies *Chaetomium globosum* (Sordariales, Chaetomiaceae) (WANG, X. W. et al., 2016a). Descrição: diâmetro da colônia (7 d, mm) em: AML 41-69; MNM 14-16 (Fig. 40A). Crescimento forma circular a irregular, textura aveludada a pulverulenta, superfície lisa ou em camadas, borda lobular, aspecto opaco a brilhante e exsudato difunde no meio de cultura, as cores variam de creme no início do crescimento de cinza a oliváceo com o amadurecimento dos ascósporos, verso castanho claro (Figs. 40B-40C).

Figura 40 - Morfoespécie Gb260, *Chaetomium* sp., cultivado em Ágar Malte Levedura (25 °C no escuro), (A, B) colônia com 28 dias, anteverso e verso respectivamente; (C) cultivado em Melin-Norkrans Modificado, exsudato difuso no meio (seta) 28 dias. (D) Peritécio liberando ascósporos pelo ostíolo, 28 dias; (E) peritécio com esporos e hifas setosas pigmentadas; (F-H) microscopia confocal de varredura, (F) ascoma com setas na parte distal, ascósporos em forma de disco com um sulco central côncavo, (G) detalhe dos ascósporos com hifas ornamentadas; (H) células conidiogênicas.



O fungo Gb260 apresentou fase holomórfica, com ascomata superficial subgloboso com 78,4 - 126,4 × 85,0 - 176,6 µm diam (Figs. 40D, 40F), ascos esvanecestes onde são produzidos ascosporos em forma de disco com um sulco central côncavo com 4,8 - 7,3 × 7,3 - 10,1 µm diam (Figs. 40E-40H). Conidióforo discreto e simples, células conidiogênicas filídicas, hialinas, formando conídio aseptado, liso, hialino, globoso com diam 2,0 - 3,5 µm (Fig. 40H).

3.3.3. Avaliação da colonização endofítica

Na avaliação da relação endofítica por inoculação, o reisolamento das morfoespécies de interesse das raízes ocorreu em: Gb207r em 100% das plantas; Gb09r em 80%; Gb47r em 57%; Gb104r em 50%; Gb225r em 57%; e Gb209' 33% (Tab. 12). O morfotipo MT2, ao qual pertence o isolado Gb207, foi o mais frequentemente observado em, ocorreu em todos os tratamentos, inclusive nos controles positivo e negativo. Alguns dos fungos reisolados foram sequenciados, e foram comparados com os fungos que haviam sido inoculados (Tab. 13).

Tabela 4 - Avaliação do teste de inoculação e reisolamento, indicando os tratamentos avaliados, dias de incubação até a avaliação. Número de plantas e seguimentos de raízes ($\pm 1,0$ cm) avaliadas em cada tratamento, e número de plantas e seguimentos onde houve reisolamento. Não inoculado = NI; reisolamento não confirmado = NC.

	Dias de Incubação	Plantas n. total	Plantas reisolamento	Seguimentos n. total	Seguimentos reisolamento
Controle +	21	5	NI	39	NI
Controle -	21	10	NI	51	NI
Gb09	14	5	4	36	16
Gb47	14	7	4	72	9
Gb104	14	6	3	45	12
Gb207	21	5	5	45	19
Gb209'	21	6	2	45	3
Gb225	21	7	4	57	9
Gb231	21	6	2	42	2NC
Gb260	14	5	1	48	3
Total	-	73	26	567	73

Na análise do índice de colonização, os testes de comparação de médias indicaram diferença significativa ($\alpha = 0,5$ $p < 0.0001$) entre os tratamentos (Tab. 14; Fig. 41). O índice de colonização foi maior (Grupo E) nos tratamentos Gb209 e Gb225, enquanto os menores índices (Grupo A) ocorreram no controle negativo e no tratamento Gb104.

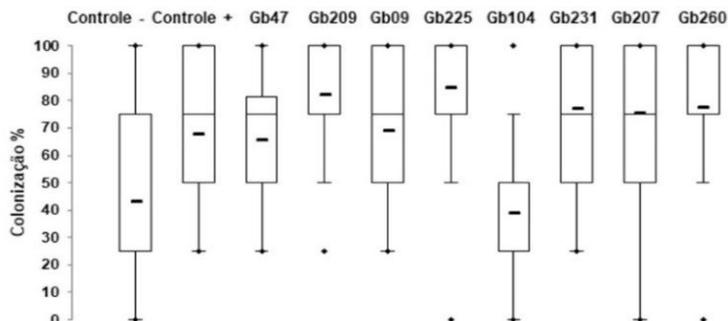
Tabela 5 - Resultado do sequenciamento de alguns fungos reisolados no experimento de avaliação da associação endofítica. “M” indicando o fungo que foi inoculado, e “r” os reisolados.

ID	PB	Referência GenBank	Similaridade GenBank	UNITE SH
Gb09M	373	U18358	99,46%	SH182481.07FU
Gb09r1	373	U18358	99,46%	SH182481.07FU
Gb09r6	393	KF706663	99,24%	SH182481.07FU
Gb104M	485	KY522683	100%	SH213620.07FU
Gb104r	406	X94173	100%	SH213620.07FU
Gb209'M	546	KF946043	100%	SH187563.07FU
Gb209'r	564	KR815445	100%	SH187563.07FU

Tabela 6 - Índice de colonização por fungos endofíticos em raízes de *Gaylussacia brasiliensis* (média e desvio padrão), em experimento com inoculação de fungos em casa de vegetação. Teste de Kruskal-Wallis $\alpha = 0,5$; K (16,92) = 974,25; p <0,0001. Comparações utilizando o Teste Dunn bilateral, formando grupos dos menos para mais colonizados A, B, C, D e E.

Tratamentos	Índice de colonização %	Grupos
Gb104	38,7 (\pm 26,1)	A
Controle -	43,2 (\pm 27,8)	A
Gb47	65,5 (\pm 26,0)	B
Controle +	67,5 (\pm 27,3)	B
Gb09	69,0 (\pm 26,0)	BC
Gb207	75,3 (\pm 26,3)	CD
Gb231	77,1 (\pm 22,0)	CD
Gb260	77,4 (\pm 22,5)	D
Gb209'	81,9 (\pm 22,3)	DE
Gb225	84,6 (\pm 22,5)	E

Figura 41 - Índice de colonização de raízes de *Gaylussacia brasiliensis* de experimento com inoculação de fungos endofíticos, isolados de raízes de plantas da mesma espécie. Tratamentos: Controle negativo (-), Controle positivo (+), inoculados com os isolados, Gb47, Gb209', Gb09, Gb225, Gb104, Gb231, Gb207, Gb260.



As estruturas de associação nas raízes das plantas inoculadas com os oito fungos previamente isolados, mostraram diversos padrões de estruturas de interface (Figs. 42 a 48).

No controle positivo, onde foi utilizado solo de origem das plantas não autoclavado, observou-se intensa colonização de estrutura de ErM típica, hifas densamente enoveladas (Figs. 43A, 43B). Nas imagens por MO se pode observar colonização dos tipos ErM (Figs. 42A-42C) e DSE (Figs. 42B, 42D). Nas raízes do controle negativo, com solo autoclavado, também foi observada colonização menos adensada, presente em muitas células, mas não preenchendo todo o seu conteúdo como ocorre na ErM.

Figura 42 - Padrões de colonização em raízes de *Gaylussacia brasiliensis* do controle positivo de experimento em casa de vegetação, imagens em microscopia óptica coradas com azul de anilina. (A) Colonização com estrutura típica de micorriza ericóide (ErM); (B) colonização por ErM e intercelularmente por endofítico septado escuro (DSE); (C) padrão diferente de ErM; (D) colonização intracelular por DSE.

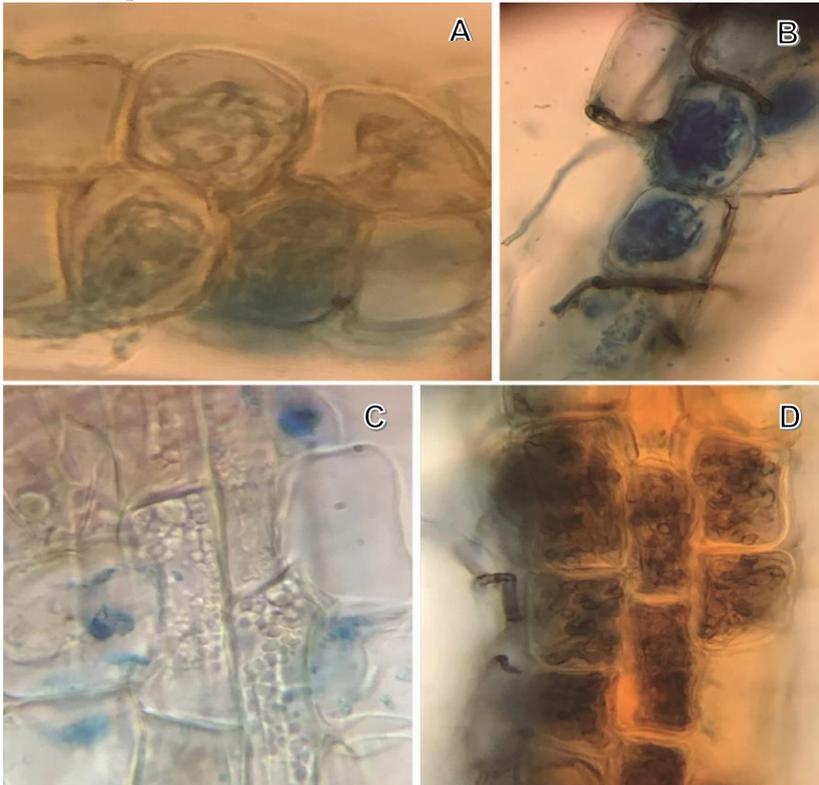
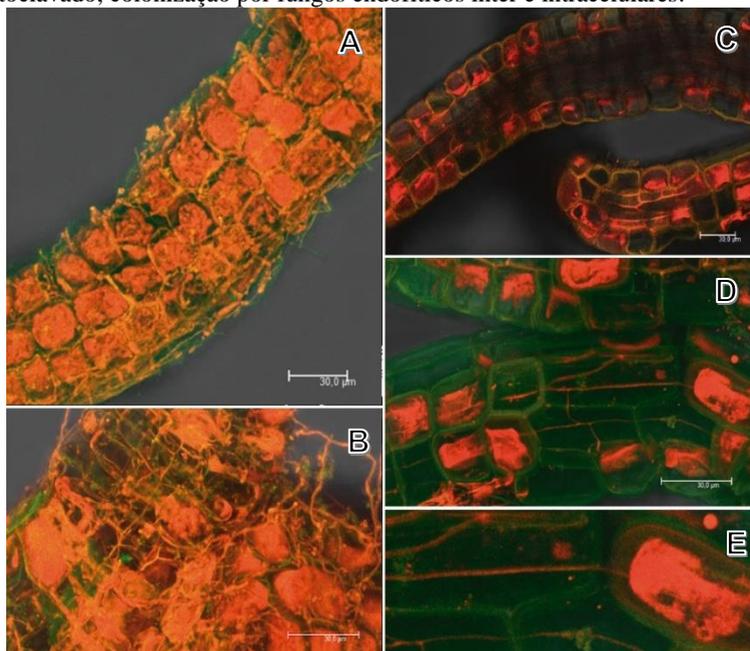


Figura 43 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis* de experimento em casa de vegetação em microscopia confocal a laser, coradas com fucsina ácida. (A, B) Controle positivo, solo de não autoclavado, intensa colonização formando enovelamento típico de micorrizas ericóides. (C, D, E) Controle negativo, solo autoclavado, colonização por fungos endofíticos inter e intracelulares.



Em alguns tratamentos de inoculação foram encontrados indícios de estruturas fúngicas de associação parecidas com as que ocorrem nos fungos isolados *in vitro*, além de estruturas que se diferenciaram das demais. Nas raízes das plantas inoculadas com *Paraconiothyrium* sp. (Gb47) talvez haja corpos de frutificação intracelulares (Fig. 44). No tratamento com *Penicillium* sp. (Gb09) aparecem estruturas tipo cleistotécios intracelulares (Fig. 45). No tratamento inoculado com *Diaporthe* sp. (Gb231), chamou a atenção a presença de estruturas nas raízes extrapolando a parede celular (Fig. 46) parecidas com o suposto alongamento do peritécio (Figs. 37D-37G). As raízes inoculadas com *Arcopilus* (Gb207) mostram corpos globosos semelhantes a esporos (Figs. 47A, 47B). O tratamento com *Chaetomium* (Gb260) apareceu estrutura extra radicular semelhante a conidióforo (Figs. 47F, 47G). Nos tratamentos inoculados com Gb104, Gb209', Gb72 foram observadas colonização com diferentes padrões (Fig. 48).

Figura 44 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis* inoculadas com a morfoespécie Gb47 (*Paraconiothyrium* sp.). Imagens em microscopia confocal a laser mostrando, (A) células colonizadas de forma frouxa, (B) no detalhe hifas passando através da parede celular (setas). (C-F) Imagens em microscopia óptica de (C) estruturas fúngicas intracelulares maiores (seta branca) e menores (seta preta), talvez corpos de frutificação em diferentes estádios; (D) que atinge o tamanho correspondente a totalidade da célula da raiz; (E) parede celular espessas; (F) colonização intercelular e microescleródio intracelular (seta).

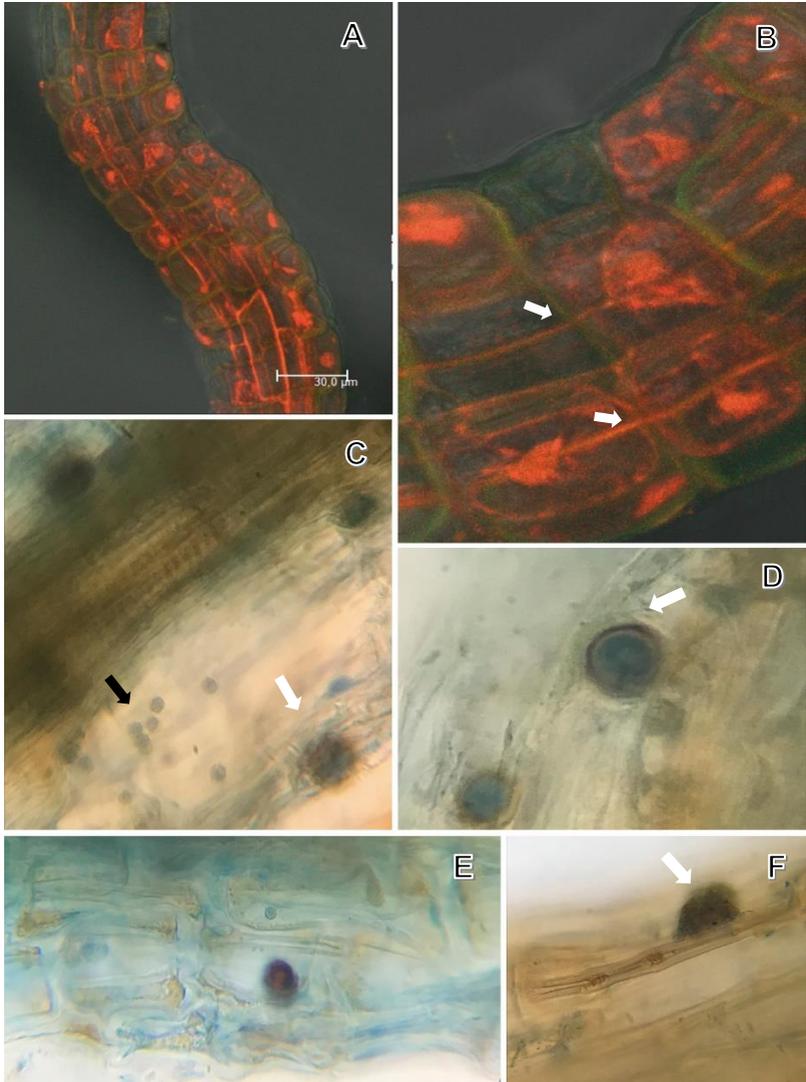


Figura 45 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis* inoculadas com a morfoespécie Gb09 (*Penicillium* sp.). Imagens em microscopia confocal a laser, (A) raiz estrutural colonizada formando ramificações de raiz capilar, (B) detalhe de intensa colonização estimulando a ramificação. (C-H) Imagens em microscopia óptica, (C) formação de numerosas estruturas semelhantes a cleistotécios em intracelularmente, (D) possivelmente células radiculares rompidas liberando cleistotécios. (E) Raiz exibindo estruturas de hifas dilatadas, se formado no interior das células e extrapolando para a parte extra radicular, semelhante a (F) estrutura formada *in vitro* (Fig. 35I e 35J). (F-I) Cultivo *in vitro* com estrutura semelhante a observada na raiz; (G, H) liberando conídios; (I) conidiogênese holoblástica.

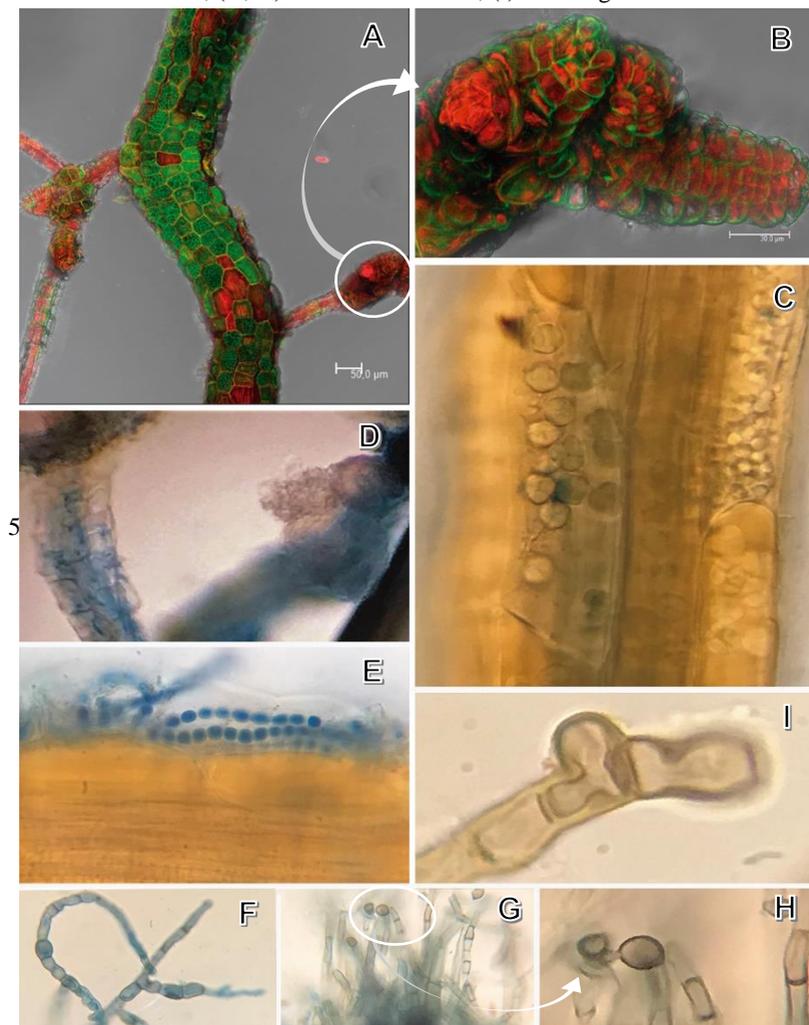


Figura 46 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis* inoculadas com a morfoespécie Gb231 (*Diaporthe* sp.). Microscopia confocal a laser mostrando (A) colonização intensa de raízes capilares, (B) detalhe de estrutura semelhante à observadas *in vitro* (Fig. 37) que pode ser um alongamento de peritécio e estrutura globosa no interior da célula vegetal (seta) (peritécio inicial?). (C) Raiz apresentando o suposto “pescoço” do peritécio saindo da célula (seta amarela) e cicatrizes nas células adjacentes (setas brancas). (D) Estrutura extrapolando a raiz com tamanho que variou entre 20 e 50 μm . (E) Raiz estrutural colonizada. (F) Esquema de seção vertical de estruturas reprodutivas de *Diaporthe parasitica* “Fig. 14” de uma pústula picnidial, cavidade lobulada com conidióforos, produz conídios que transpassam o tecido do hospedeiro; “Fig. 15” pústula peritecinal, com vários peritécios mostrando o comprimento total dos pescoços Fonte: HEALD (1913).

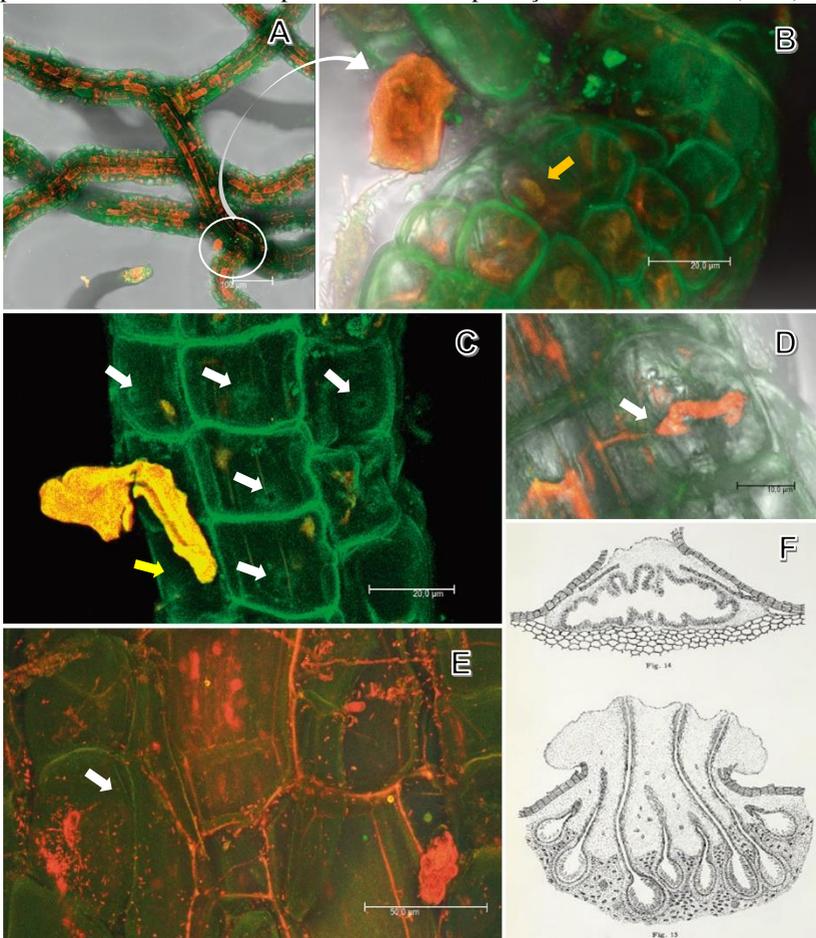


Figura 47 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis*, oriundas de experimento de inoculação com fungos endofíticos. Imagens de microscopia confocal a laser do (A-E) tratamento Gb207 (*Arcopilus* sp.). (A) Raízes intensamente colonizadas, (B) com estruturas fúngicas globosas que podem ser esporos, as paredes da raiz parecem estar em degeneração; (C) células totalmente preenchidas por fungos. (D, E) Tratamento Gb260 (*Chatetomium* sp.), estrutura extra radicular parecida com conidióforo.

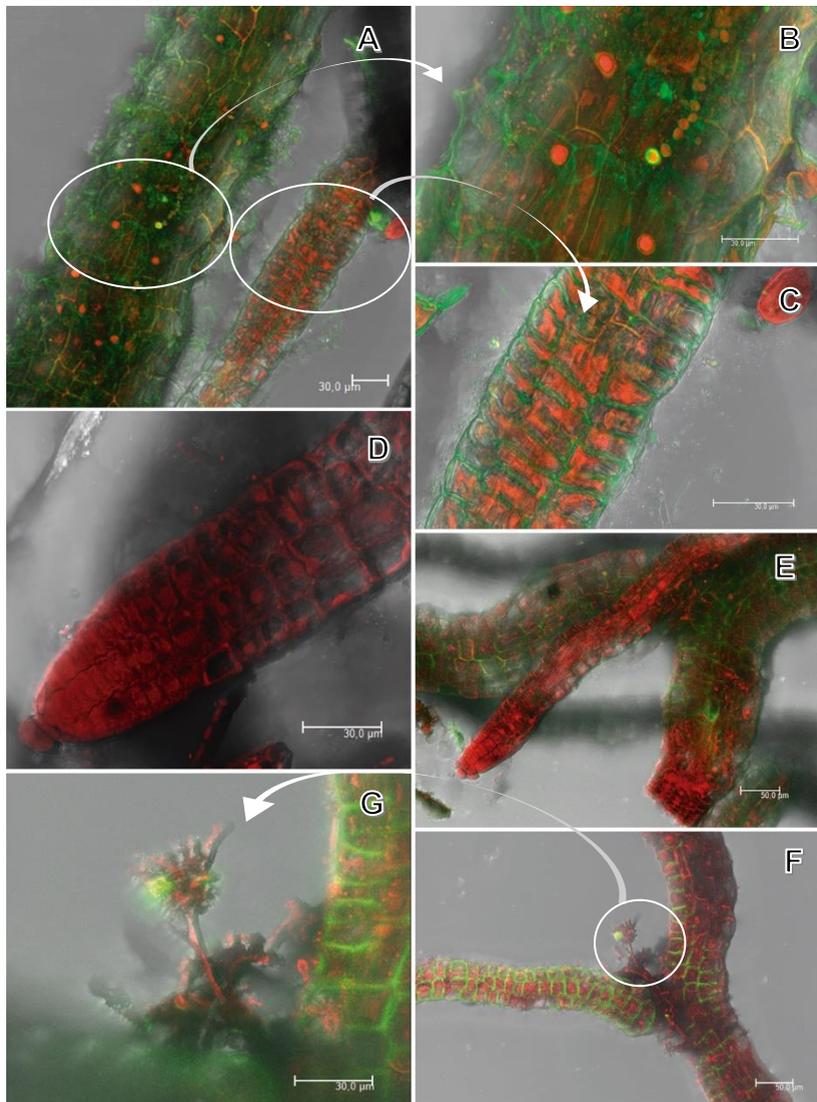
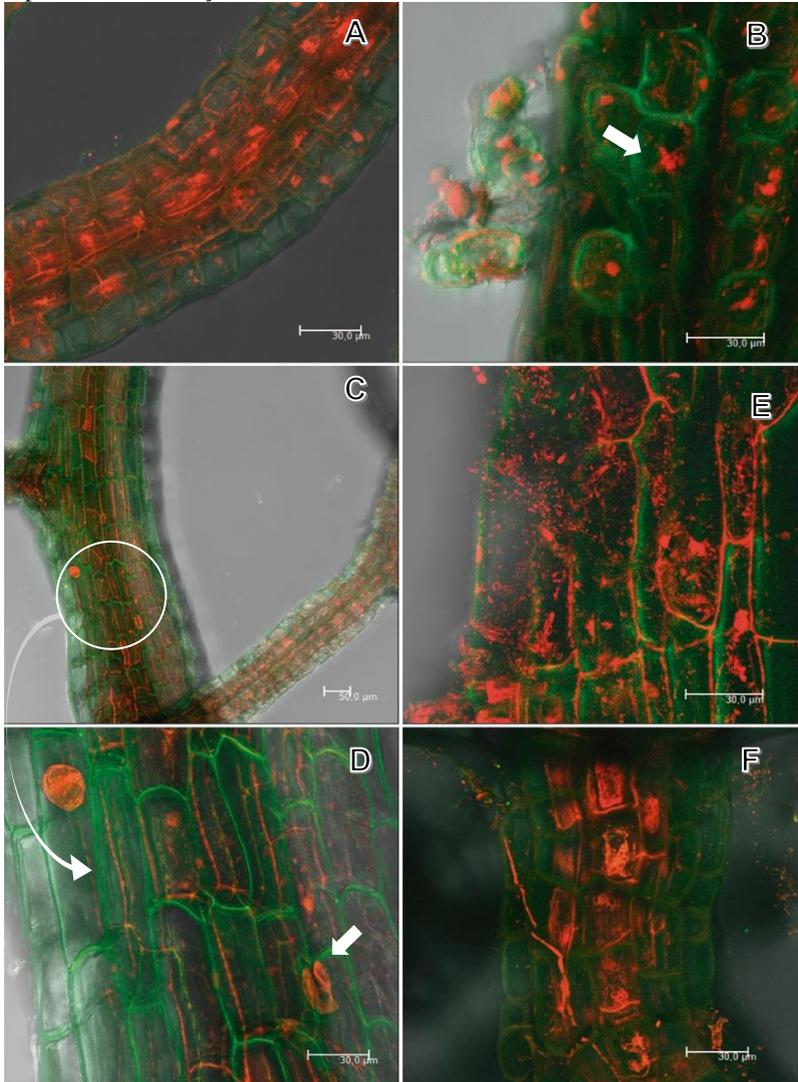


Figura 48 - Raízes de *Gaylussacia brasiliensis* inoculadas com fungos endófitos em microscopia confocal a laser. (A) Tratamento Gb104 (*Fusarium* sp.) colonização intra e intercelular; (B) Tratamento Gb225 (*Cladophialophora* sp.) pouco investimento em hifas e estruturas tipo escleródios (seta). (C-E) Tratamento Gb209 (*Curvularia* sp. + Basidiomycota), (C) raiz estrutural e capilar colonizadas, (D) no detalhe estrutura fúngica diferenciada. (E) Gb209 liberação de estruturas fúngicas. (F) Tratamento Gb72 (Ascomycota sp.) parede celular espessada, colonização intracelular com estrutura diferenciada.



3.3.4. Forma de transmissão

Na avaliação da transmissão vertical, por meio de sementes, não houve desenvolvimento de fungos em meio de cultivo, indicando resultado negativo. Mas, como foi realizada uma desinfecção prévia, não se pode descartar a presença de fungos no tegumento que colonizarão endofiticamente a planta.

Para a transmissão horizontal pelo caule, houve desenvolvimento de duas morfoespécies, que não foram identificadas. No *lignotuber* houve crescimento de pelo menos três morfoespécies (Fig. 47), com predominância do morfotipo MT2. Deste grupo foi isolado um fungo representante, denominado morfoespécie Gb261L, esta foi classificada por morfologia e sequenciamento, apresenta similaridade com Gb207 (Tab. 10).

Figura 49 - Teste de transmissão horizontal por isolamento de fungos do *lignotuber* de *Gaylussacia brasiliensis*. (A) Fragmento de *lignotuber* utilizado para isolamento de endofíticos (seta verde); (B) colônias de fungos endofíticos isoladas de lignotuber, placa da esquerda morfotipo MT2 (Gb261L) identificado como *Arcopilus* sp., placa da direita fungo sp1 e Fungo sp2.



Os isolados analisados neste capítulo foram depositados na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI, onde serão identificados mais precisamente.

3.4. DISCUSSÃO

A maior parte dos endofíticos cultivados a partir das raízes de *Gaylussacia brasiliensis* pertencem ao filo Ascomycota, o que está de acordo com estudos sobre endofíticos em Ericaceae (BIZABANI, 2015; BOUGOURE et al., 2007; GORZELAK; HAMBLETON; MASSICOTTE, 2012). Obviamente isto está relacionado ao método de

isolamento utilizado. Assim como a frequência de isolamento dos morfotipos se relaciona a facilidade de isolamento, cultivo e preservação de cada espécime. Em alguns estudos, principalmente por método direto, tem sido constatada a frequência maciça de Basidiomycota (ALLEN et al., 2003; BERCH; ALLEN; BERBEE, 2002; SELOSSE; BAUER; MOYERSON, 2002; SELOSSE et al., 2007).

Foi atribuída uma classificação geral de morfoespécies e funções potenciais com base em características morfológicas indicadoras sem testar experimentalmente a grande quantidade de culturas isoladas. Esta abordagem é aceita em trabalhos com microfungos não identificados, para obter uma avaliação viável rápida da biodiversidade e compreensão geral das funções prováveis (Arnold, 2000).

Para a identificação taxonômica o sequenciamento e morfologia foram complementares, mas não definitivos, pois a região ITS, por ser bastante conservada, nem sempre é eficiente para obter especificidade na identificação (TEDERSON; LINDAHL, 2016). Sendo assim, mesmo que tenham sido indicadas similaridades com espécies, optou-se por utilizar a identificação a nível de gênero. Ainda restaram dúvidas quanto a classificação que só podem ser sanadas com sequenciamento com *primers* específicos para os diferentes grupos de fungos (STIELOW et al., 2015).

Foi possível estabelecer algumas características agrupadoras, que podem ser associados como indicadores de estilo e estratégias de vida. A análise morfológica das colônias *in vitro*, assim como da estrutura de associação na colonização das raízes mostrou traços funcionais, que influenciam fortemente o desempenho dos organismos. Os fungos analisados têm em comum características que fornecem resistência e tolerância a fatores ambientais.

Estas estruturas estão relacionadas tanto com a interface de associação nas células vegetais, como a vida livre no solo. Foram observadas estruturas de resistência tais como clamidósporo, escleródio, estroma, tipos de corpos de frutificação; estruturas de dispersão, como tipos de conidioma, ascoma, diferentes tamanhos e formas de esporos, além de padrões de crescimento micelial, e estratégias de proteção como pigmentação do talo e outras partes (melanização) e produção de exsudatos (metabólitos secundários).

A formação de estruturas do tipo escleródio ou estroma apareceram frequentemente nos fungos estudados, indicando ser uma importante estratégia em endofíticos ericóides. O termo escleródio é também usado em um sentido funcional, sendo uma estrutura formada por hifas fortemente entrelaçadas e rica em substâncias de reserva, e é

perdurante duro, capaz de desprender-se do corpo do fungo (WEBSTER; WEBER, 2007). Esta estrutura é resistente a condições desfavoráveis, podendo permanecer dormente ou quiescente por longo período e germinar quando se apresentam condições favoráveis.

A estratégia reprodutiva é um indicativo fundamental de estilo de vida, uma das suas expressões é o tipo de reprodução, sexual ou assexual. Todos os oito fungos analisados formaram esporos mitóticos e/ou meióticos *in vitro*, isto não significa que essas funções se repetem a campo, e sim o potencial de expressão. Os organismos assexuados têm uma dupla vantagem sobre os coespecíficos sexuais, podendo se disseminar efetivamente. Em contraste, a reprodução sexual elimina eficientemente mutações deletérias e cria variação genética, que favorece a seleção natural e acelera a adaptação a ambientes em mudança (ZAFFARANO et al., 2011).

Na reprodução assexuada espera-se obter indivíduos geneticamente idênticos, no entanto a reprodução sexuada entre esses organismos geneticamente idênticos pode ser submetida a efeito mutagênico, o que significa que podem criar mudanças genéticas e diversidade, que podem ser benéficos para a sobrevivência do organismo (WEBSTER; WEBER, 2007). Isso permite vislumbrar uma estratégia evolutiva dos fungos para se disseminar efetivamente, com capacidade adaptativa fornecida pela variabilidade genética, e continuar a desempenhar suas funções ecológicas.

Outro fator reprodutivo é a dispersão, expressa pela morfologia do conidioma ou ascoma e dos esporos. Para que um fungo se disperse efetivamente, os conídios ou esporos devem primeiro ser liberados do conidióforo ou esporóforo, passivamente ou ativamente por descarga de esporos. Os ascos normalmente libertam os esporos por descarga ativa iniciada a partir da sua extremidade distal, através do opérculo. No entanto, também podem fazer isso de forma passiva exsudando um líquido ou sob a forma de uma massa pulverulenta seca.

Os fungos avaliados têm em comum corpos de frutificação diminutos, adaptados ao endofitismo em tecidos vegetais. Elucidar as estratégias de dispersão desses simbiontes fúngicos contribui para a compreensão de sua interação com as plantas e fornece informações sobre os fatores que potencialmente impulsionam a evolução de ascomata reduzidos em Pezizomycotina.

Em *Penicillium* sp. (Gb09) a estratégia observada foi a formação de cleistotécios, que fornecem resistência e dispersão eficiente de numerosos ascósporos (WYATT; WÖSTEN; DIJKSTERHUIS, 2013).

Em ericáceas é comum o relato de fungos cleistoteciais, principalmente Onygenales (HAMBLETON, 1998). Neste isolado, houve formação abundante e precoce de cleistotécios (Fig. 35), que exibiu sinais de maturidade de ascósporos a partir da segunda semana de incubação e que perdurou por pelo menos mais de 60 dias.

Neste suposto *Penicillium* existem indícios de que não ocorre a deiscência do cleistotécio, pois não foi observada a abertura natural, formação de linha de deiscência (GREIF; CURRAH, 2007) ou desintegração da parede peritecial (SOHN; YOON, 2002). Embora as observações tenham sido realizadas em ambiente artificial e que as condições naturais como umidade, temperatura entre outras possam afetar a indução da dispersão dos ascósporos. Uma vez que, grande parte dos ascósporos de ambientes extremos descritos, são formados em cleistotécios, que algumas vezes possuem dormência, para esperar condições adequadas para germinação dos esporos (WYATT; WÖSTEN; DIJKSTERHUIS, 2013).

No entanto, uma vez que a questão da dispersão dos ascósporos em *Penicillium* não está firmemente estabelecida (NIRENBERG; METZLER, 1990), e parece haver uma lacuna de informações devido à grande variação por adaptação dentro do gênero, é possível levantar a hipótese que a dispersão acontece através de poros no perídio esclerotióide (Fig. 35E, 35F). Esse ascoma é esférico e liso, conferindo eficiência em dispersão na água o que permitiria que ele rolasse nos espaços do solo liberando um ascósporo por vez, de forma passiva, eficiente e prolongada. Se esta habilidade for confirmada, pode estar fornecendo a este fungo a capacidade de dispersão em relação a tempo e espaço, sendo que percorrerá um grande percurso, por um longo período.

O grupo de fungos mais comum, presente em praticamente todas as amostras, foram Chaetomiaceae. Pela frequência de isolamento esta família de fungos parece possuir uma íntima relação com *G. brasiliensis*. Chaetomiaceae têm sido frequentemente isolados em raízes de Ericaceae (TIAN et al., 2011; BIZABANI, 2015; DIXON; SIVASITHAMPARAM; READ, 2004), e em partes aéreas de diversas plantas (SCHULZ; BOYLE, 2005). O fungo isolado do *lignotuber*, foi também identificado como *Arcopilus sp.* (Gb261), o que indica transferência horizontal, podendo então ser classificado como endofítico classe 2.

A característica indicadora de função neste estudo foi a grande produção de exsudatos. Fungos do tipo *Chaetomium* são estudados pela intensa produção de metabólitos secundários de interesse em diversas áreas (SCHULZ et al., 2002; SANTOS; VARAVALLI, 2011;

BETTIOL; MORANDI, 2009; PAN et al., 2016; KOBAYASHI et al., 2005; KUMAR; KAUSHIK; PROKSCH, 2013). A maioria das espécies compreende decompositores de celulose (WANG et al., 2016b).

Esses isolados formam numerosos ascomata do tipo peritécio. *Arcopilus* sp. (Gb207 e Gb261) formou exclusivamente esporos meióticos. A espécie do complexo *Chaetomium globosum* (Gb260) também formou numerosos ascósporos com um formato muito eficiente para dispersão (Fig. 40G, 40H). As setas periteciais desses fungos podem assumir uma variedade de formas, dependendo da espécie, os ascósporos se acumulam em uma massa densa fora do peritécio. O peritécio setoso desses fungos é bem adaptado para dispersão pelo ar, no entanto, talvez eles podem perder as setas para se dispersarem pelo solo (Fig. 40F).

Pleosporales vem sendo detectados em Ericaceae (BERCH; ALLEN; BERBEE, 2002; BRUZONE; FONTENLA; VOHNÍK, 2015). Em *Paraconiothyrium* sp. (Gb47) foi observada estrutura reprodutiva assexuada, em picnídios complexos, submersos no meio de cultura, onde ocorre formação de conídios. Este fungo foi reisolado em quase 60% das plantas no experimento de inoculação, é de fácil cultivo e preservação. Na interface de associação nas raízes foram observadas estruturas tipo microscleródios, além de hifas inter e intracelulares.

A pesquisa sobre *Paraconiothyrium* tem sido voltada para o interesse nos metabólitos secundários produzidos por esses fungos (COMBÈS et al., 2012; LIU et al., 2010; SHIONO et al., 2011). Foi investigada a ação do fungo endofítico *Paraconiothyrium variabile*, isolado das folhas de *Cephalotaxus harringtonia*, no metaboloma secundário da planta hospedeira, e verificaram que existe uma cooperação química subjacente à relação mutualista entre a planta e o endofítico, que age na biotransformação de flavonoides (TIAN et al., 2014).

O integrante do complexo de espécies *Curvularia* (Gb209'), é relatado como DSE e mostrou aumentar a termotolerância dos simbiontes (REDMAN et al., 2002), além de promover o crescimento através da solubilização de fosfato e produção de fitormônio (PRIYADHARSINI; MUTHUKUMAR, 2017), também tendo função saprofítica (DAY; CURRAH, 2011).

Como representante de Hypocreales foi identificado um fungo do gênero *Fusarium*, o isolado ocasionalmente produz exsudato que se difunde no meio de cultura. Fungos endofíticos deste gênero tem sido frequentemente isolados e avaliados (AIMÉ et al., 2013; LESLIE; SUMMERELL, 2006; MUSAVI; BALAKRISHNAN, 2013). Rodriguez et al. (2008) avaliaram a tolerância a salinidade e ao calor em *Leymus*

mollis, conferida pelos endofíticos *Fusarium* e *Curvularia*, verificaram que a tolerância ao estresse, simbioticamente conferida, é um fenômeno específico do habitat, ou seja, a simbiose adaptada ao habitat é responsável pelo estabelecimento de plantas em habitats de alto nível de stress.

Da ordem Chaetothyriales foi identificado *Cladophialophora* sp. (Gb225), que faz parte do grupo chamado “leveduras negras”. Trata-se de um grupo de fungos heterogêneos quanto à taxonomia e filogenia, mas que tem em comum paredes celulares melanizadas e a formação de células filhas tipo levedura por brotação multilateral ou polar (STERFLINGER, 2006). A natureza extremofílica das leveduras negras da família Herpotrichiellaceae, em combinação com a sua capacidade para metabolizar contaminantes aromáticos, torna-as organismos ideais para fins específicos de biorremediação (ZHAO et al., 2010). A estrutura de associação nas raízes inoculadas com Gb225, apresenta colonização intracelular semelhante a microescleródios nas raízes (Fig. 40F), e foi um tratamento que apresentou alto índice de colonização.

Sete dos oito fungos inoculados puderam ser reisolados, sendo que fungos da família Chaetomiaceae mostraram ter uma relação importante com *G. brasiliensis*. Aparentemente, os fungos inoculados formaram estruturas de associação endofíticas, mas não formaram as estruturas típicas de micorrizas ericóides. Baseado no critério de frequência de isolamento e reisolamento, os resultados indicam que os fungos avaliados são potenciais formadores de associação simbiótica com *G. brasiliensis* (Tab. 12). A identificação e a caracterização de fungos como micorrízicos ou endofíticos dificilmente podem ser definitivas. Padrões repetidos de isolamento e/ou morfologia endorrízica consistentes do fungo, quando inoculado em supostos simbiontes, são critérios desejáveis para designar um táxon como endofítico (ADDY; PIERCEY; CURRAH, 2005).

O resultado da análise quantitativa da colonização, no experimento de inoculação, indica diferença significativa entre os tratamentos (Tab.18). O controle negativo, no qual foi utilizado o solo natural das plantas teve índice de colonização maior, juntamente com os tratamentos Gb231 e Gb47. O controle negativo, em que foi utilizado o solo autoclavado, embora colonizado (Tab. 14; Fig. 39), obteve o menor índice de colonização, igualando-se aos outros tratamentos.

A avaliação qualitativa das interfaces de associação (Figs. 40-46) mostrou a diversidade de estruturas formadas na associação com fungos endofíticos. Aparentemente existem tantas estruturas de associação quanto fungos capazes de produzi-las. Nos tratamentos em que foram

inoculados com Gb09, Gb47, Gb207 e Gb231, foram encontradas estruturas fúngicas nas raízes que podem estar indicando efetividade dessa associação, pois se assemelham a estruturas fúngicas encontradas *in vitro*.

Essas estruturas chamam a atenção principalmente por não estarem descritas em raízes de ericáceas. No entanto, não se pode afirmar que as estruturas indicadas nas figuras são formadas pelos fungos inoculados, pois não foram realizadas análises comparativas entre os tratamentos. Além disso, as plantas do controle negativo estavam também colonizadas no momento da análise, sendo assim as estruturas podem ser formadas por outros fungos, ou mesmo podem ser artefatos das imagens.

A morfoespécie Gb231, identificada como *Diaporthe* sp., não foi passível de reisolamento no experimento, mas a evidência de simbiose pode estar no índice de colonização, que foi relativamente mais alto do que nos outros tratamentos, e na estrutura de associação nas raízes. Fungos do gênero *Diaporthe* possuem peritécio com um longo pescoço que transpassa o tecido do hospedeiro, como apareceu em raízes saudáveis que haviam sido inoculadas com Gb231.

Para confirmar que determinado fungo forma alguma estrutura em raízes de *G. brasiliensis*, é necessária uma avaliação mais adequada, como por exemplo hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), onde as estirpes de fungos expressam proteínas fluorescentes podendo assim estudar as interações, oligonucleotídeos com fluoróforos marcados são hibridizados com o RNA podem tornar o citoplasma todo visível além de indicar a atividade metabólica dos fungos (VÁGI et al., 2014).

A abordagem *trait-based* para análise de comunidades de fungos mostra-se uma interessante ferramenta para pesquisa ecológica, mas, devido à alta complexidade, pouca padronização de análise e diversificada formas de abordagem, existem poucas modelagens com dados reais (AGUILAR-TRIGUEROS; RILLIG, 2016). Ainda assim, certamente contribui para estudos sobre fungos endofíticos ericóides e ecologia fúngica, demonstrando relevância funcional das características morfológicas.

A maior parte dos fungos isolados demonstrou versatilidade no estilo de vida, sendo habitantes tanto das plantas quanto do solo. Aparentemente eles evoluíram para tornarem-se eficientes no crescimento e na absorção de nutrientes no solo e nas plantas. Também se supõe que os fungos avaliados, ou alguns deles, parecem colonizar sistematicamente as raízes e parte aérea (endofíticos classe 2), sendo essa característica definida por sofisticados estímulos bioquímicos (BOYLE et

al., 2001; PEROTTO et al., 1995; SCHULZ et al., 1999; SCHULZ; BOYLE, 2005).

A associação com diversos fungos simbióticos representa para planta uma estratégia para ampliar a gama de funções na colonização de substratos difíceis. Dos isolados analisados, todos mostraram potencial para futuros trabalhos de utilização para produção de ericáceas e outras famílias, pois podem ser facilmente isolados, cultivados e preservados. De forma similar *G. brasiliensis* mostrou ser uma interessante planta para prospecção de fungos para produtos biotecnológicos.

Para o estudo de fungos endofíticos ericóides é necessário relativizar o sistema de classificação baseado em características morfológicas ou funções ecológicas. Um fungo não é micorrízico ericóide ou endofítico, e sim pode-se dizer que a relação que ele estabeleceu em um contexto está expressa por determinada estrutura. A plasticidade dos fungos endofíticos dificulta e limita esta classificação, pois a morfologia e as funções ecológicas são determinadas por um sistema complexo e dinâmico que envolve a relação dos fungos com a planta simbiote, interação com outros micro-organismos, além de estímulos abióticos.

No presente trabalho a tentativa de classificação por morfologia não se mostrou consistente frente a complexidade dessas interações. As estruturas de associação possuem interface significativa, e adaptações especialidades para o mutualismo. A diversidade ecológica e diversidade funcional, são ricas fontes de pesquisa que necessitam de atenção e métodos adequados que abranjam a complexidade destas relações.

4. DISCUSSÃO GERAL

Gaylussacia brasiliensis possui uma complexa rede de relações simbióticas que possibilitaram que ela ocupasse biomas com diferentes características, sendo em geral xéricos. Embora muitos desses biomas tenham sido afetados pela ação antrópica, a ampla distribuição pode estar, no momento, garantindo a sua conservação de modo global, mesmo que algumas populações tendam a desaparecer ou se tornarem clonais, pela propagação vegetativa e fragmentação dos ecossistemas. *G. brasiliensis*, ao que tudo indica, possui plasticidade que permite a adaptação a polinizadores, sendo que isto fornece certa segurança de que a diversidade será mantida, mesmo com mudanças na dinâmica de polinizadores, seja por ocupação de nichos com diferentes características, seja pela alteração da frequência ou presença de polinizadores. No entanto, *G. brasiliensis* é dependente de visitas de animais que atendam ao critério de sonicar suas flores.

Da mesma forma a ubiquidade de colonização das raízes por fungos, e a grande diversidade destes, indicam uma relação de dependência destes micro-organismos para sobrevivência a nível de indivíduo. Sendo assim, embora a camarinha tenha potencial de uso, não se pode pensar num processo de melhoramento sem envolver também seus organismos associados, ou mesmo sem considerar a integridade do ecossistema ocupado por esta espécie.

Cabe aqui destacar as lições aprendidas em relação aos métodos de estudo, principalmente com a bioprospecção de microfungos endofíticos. A abordagem taxonômica polifásica é fundamental para a identificação de fungos, pois não se pode subestimar as dificuldades inerentes a este processo, tanto na abordagem morfológica quanto na molecular. No entanto, sugere-se que a abordagem siga um caminho contrário àquele seguido nesta pesquisa. Aqui partimos da abordagem fenotípica e no último passo da pesquisa fizemos a abordagem genotípica. Tal caminho levou a um período “tateando no escuro”, e ocasionou um não aproveitamento do potencial de avaliação desses fungos. Além de trazer riscos a pesquisa tais como: (a) iniciar o trabalho com um fungo e acabar com outro (contaminação); (b) aplicar técnicas inadequadas de cultivo e conservação, pois cada fungo possui suas especificidades; (c) não explorar o potencial do micro-organismo, por não saber com que se está trabalhando; (d) não se ter confiabilidade dos resultados; (e) ocorrer possível perda de tempo e recursos.

Sendo assim, para futuras pesquisa que envolvam bioprospecção de microfungos e/ou estudos ecológicos é sugerido:

- 1) Desenvolver e sistematizar método de conservação de acervo de pesquisa de fungos do nicho ecológico de interesse.
- 2) Manter homogeneidade morfológica.
- 3) Saber que cultura monospórica restringe a diversidade genética, mas cultura oriunda de muito tecido pode conter diversidade que pode confundir a sistematização.
- 4) Logo após o isolamento proceder o sequenciamento, ou ao menos a extração de DNA, dos fungos selecionados para o estudo.
- 5) Depositar as culturas em um banco de fungos confiável, tão cedo quanto possível, e não apenas quando um número de *Culture Collection* é necessário para uma publicação.
- 6) As culturas devem ser mantidas em pelo menos triplicata, e aplicando-se procedimentos de preservação diferentes (por exemplo, congelados, em água, em cultura ativa), pois alguns fungos não se adaptam a alguns métodos para conservação *ex situ*.
- 7) Cada fungo tem particularidades que devem ser observadas, por isso a importância de saber com o que se está trabalhando.
- 8) Formar um catálogo com o objetivo de registro dos isolados, material fotográfico das colônias em cultivo, assim como de estruturas microscópicas.

Seguindo esses passos será mais provável obter sucesso nas pesquisas sobre fungos endofíticos que possuem enorme potencial biotecnológico, além da importância da conservação *in situ*. As possibilidades de estudos são imensas. A integração de dados morfológicos com informações moleculares e da diversidade facilmente cultivada, seria um grande avanço no tema dos fungos endofíticos ericóides no Brasil. Isso pode contribuir com a construção de padrões biogeográficos, ajudando a preencher a lacuna sobre essas informações na América do Sul. Tais informações podem contribuir para atribuir valor potencial dos endofíticos ericóides como indicadores para a espécies de Ericaceae, e futuramente a inclusão de fungos em programas de monitoramento ambiental.

A detecção de fungos por meio de metagenômica de material extraído das raízes também pode dar suporte a estudos ecológicos, assim como para a busca de organismos determinados, pois pode-se buscar o

isolamento pelo uso de meios de cultura adequados e diferenciação morfológica.

Por fim, o estudo de organismos que se adaptaram a ambientes severos ou extremos pode fornecer informações e material importantes, frente à preocupação mundial com produção de alimentos, produtos alternativos para agricultura, para a saúde humana, e para a indústria de modo geral. Isso inclui também biorremediação e tantas outras soluções biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B. et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer research**, v. 24, n. 5A, p. 2783–840, 2004.
- AGUILAR-TRIGUEROS, C. A. et al. Ecological understanding of root-infecting fungi using trait-based approaches. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 7, p. 432–437, 2014.
- AGUILAR-TRIGUEROS, C. A. et al. Branching out: Towards a trait-based understanding of fungal ecology. **Fungal Biology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 34–41, 2015.
- AGUILAR-TRIGUEROS, C. A.; RILLIG, M. C. Effect of different root endophytic fungi on plant community structure in experimental microcosms. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 22, p. 8149–8158, 2016.
- AIMÉ, S. et al. The endophytic strain *Fusarium oxysporum* Fo47: a good candidate for priming the defense responses in tomato roots. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 26, n. 8, p. 918–26, 2013.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MINS, C. W; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4 ed. New York: John Wiley, 1996.
- ALLEN, E. B. The restoration of disturbed arid landscapes with special reference to mycorrhizal fungi. **Journal of Arid Environments**, v. 17, p. 279–286, 1989.
- ALLEN, T. R. et al. Culturing and direct DNA extraction find different fungi from the same ericoid mycorrhizal roots. **New Phytologist**, v. 160, n. 1, p. 255–272, 14 Aug. 2003.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- ANTÔNIO, M. A. **Atividade antitumoral, isolamento e identificação de princípios ativos da *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. (Ericaceae)**. Tese (Doutorado em Clínica médica) – Faculdade de Ciências Médicas. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2004.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, Beatriz. **Morfologia de sistemas subterrâneos: histórico e evolução do conhecimento no Brasil.** Ribeirão Preto: A. S. Pinto: 2003.

ARAÚJO, F. P.; BARBOSA, A. A. A.; OLIVEIRA, P. E. Floral resources and hummingbirds on an island of flooded forest in Central Brazil. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 206, n. 9, p. 827–835, 2011.

ARAÚJO, F. P.; FARIAS, F. E. Y.; OLIVEIRA, P. E. Biologia floral e visitantes de *Gaylussacia brasiliensis* (Spr.) Meissner (Ericaceae) – uma espécie com anteras poricidas polinizada por beija-flores. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 387–394, 2011.

ARMBRUSTER, W. S. et al. Integrated phenotypes: understanding trait covariation in plants and animals. **Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences**, v. 369, p. 20130245, 2014.

ARNOLD, A. E. et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, n. 4, p. 267–274, 2000.

ARX, J. A. von. **The genera of fungi sporulating in pure culture.** 3 ed. J. Cramer Lehre, 1981.

ASHFORD, A. E.; ALLAWAY, W. G.; REED, M. L. A possible role for the thick-walled epidermal cells in the mycorrhizal hair roots of *Lysinema ciliatum* R. Br. and other Epacridaceae. **Annals of Botany**, v. 77, n. 4, p. 375–381, 1996.

AZEVEDO FILHO, W. S. et al. **Técnicas de preparação de amostras para estudos de insetos com microscópio eletrônico de varredura Comunicado Técnico Embrapa Clima Temperado.** Pelotas, RS: [s.n.].

BACHELER, R. J. **Barrens upland-wetland site and the effect of mycorrhizal.** Dissertação (Mestre em Ciências) - Graduate Program in Biology Graduate School-Camden. Rutgers University. New Jersey, 2014.

BAHRAM, M.; PEAY, K. G.; TEDERSOO, L. Local-scale biogeography and spatiotemporal variability in communities of mycorrhizal fungi. **New**

Phytologist, v. 205, p. 1454–1463, 2014.

BÁLINT, M. et al. Millions of reads, thousands of taxa: microbial community structure and associations analyzed via marker genes. **FEMS microbiology reviews**, v. 6, n. 24, p. 1–55, 2016.

BALKENIUS, A.; DACKE, M. Learning of multi-modal stimuli in hawkmoths. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e71137, 2013.

BALKENIUS, A.; KELBER, A. Colour preferences influences odour learning in the hawkmoth, *Macroglossum stellatarum*. **Naturwissenschaften**, v. 93, n. 5, p. 255–258, 2006.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. New York: Amer Phytopathological Society, 1987.

BARRETT, S. C. H.; KOHN, J. R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: FALK, D. A.; HOLSINGER, K. E. (Eds.). . **Genetics and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, 1991.

BASKIN, C.; BASKIN, J. **Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. 2. ed. San Diego, CA: Academic Press, 2014.

BATTY, A. L. et al. Orchid conservation and mycorrhizal associations. In: SIVASITHAMPARAM, K.; DIXON, K. W.; BARRETT, R. L. (Eds.). **Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity**. [s.l.] Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 195–226.

BECK, J.; KITCHING, I. J.; LINSENMAIR, K. E. Effects of habitat disturbance can be subtle yet significant: biodiversity of hawkmoth-assemblages (Lepidoptera: Sphingidae) in Southeast-Asia. **Biodiversity and Conservation**, v. 15, n. 1, p. 465–486, 2006.

BEHIE, S. W.; BIDOCHKA, M. J. Nutrient transfer in plant-fungal symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 11, p. 734–740, 2014.

BELL, T. L.; PATE, J. S.; DIXON, K. W. Relationships between fire response , morphology , root anatomy and starch distribution in South-

west Australian Epacridaceae. **Annals of Botany**, v. 77, p. 357–364, 1996.

BELLEMAIN, E. et al. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. **BMC microbiology**, v. 10, p. 189, 2010.

BENDING, G. D.; READ, D. J. Effects of the soluble polyphenol tannic acid on the activities of ericoid and ectomycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 12, p. 1595–1602, 1996.

BERCH, S. M.; ALLEN, T. R.; BERBEE, M. L. Molecular detection, community structure and phylogeny of ericoid mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v. 244, p. 55–66, 2002.

BESSEY, E. A. **Morphology and taxonomy of fungi**. Philadelphia: The Blakiston Company, 1950.

BIZABANI, C. **The diversity of root fungi associated with *Erica* species occurring in the Albany centre of endemism**. [s.l.] Rhodes University, 2015.

BIZABANI, C.; DAMES, J. Effects of inoculating *Lachnum* and *Cadophora* isolates on the growth of *Vaccinium corymbosum*. **Microbiological Research**, v. 181, p. 68–74, 2015.

BONFANTE-FASOLO, P.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Ultrastructural aspects of endomycorrhiza in the Ericaceae: I. Naturally aspects of endomycorrhiza in the Ericaceae. **New Phytologist**, v. 83, p. 739–744, 1979.

BONFANTE-FASOLO, P.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Ultrastructural aspects of endomycorrhiza in the Ericaceae: III. Morphology of the dissociated symbionts and modifications occurring during their reassociation in axenic culture. **New Phytologist**, v. 91, n. 4, p. 691–704, 1982.

BONFANTE-FASOLO, P.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; MARTINENGO, L. Ultrastructural aspects of endomycorrhiza in the ericaceae: IV. Comparison of infection by *Pezizella ericae* in host and non-host plants. **New Phytologist**, v. 98, p. 329–333, 1984.

BOSHIER, D. et al. Is local best? Examining the evidence for local adaptation in trees and its scale. **Environmental Evidence**, v. 4, n. 1, p. 20, 2015.

BOSHIER, D. H.; GORDON, J. E.; BARRANCE, A. J. Prospects for *circa situm* tree conservation in Mesoamerican dry-forest agroecosystems. In: FRANKIE, G. W.; MATA, A.; VINSON, S. B. (Eds.). **Biodiversity conservation in Costa Rica: Learning the lessons in a seasonal dry forest**. Berkeley: University of California Press, 2004. p. 210–226.

BOSSDORF, O.; RICHARDS, C. L.; PIGLIUCCI, M. Epigenetics for ecologists. **Ecology letters**, v. 11, n. 2, p. 106–15, Feb. 2008.

BOUGOURE, D. S. et al. Diversity of fungi in hair roots of Ericaceae varies along a vegetation gradient. **Molecular ecology**, v. 16, n. 21, p. 4624–36, Nov. 2007.

BOUGOURE, D. S.; CAIRNEY, J. W. G. Fungi associated with hair roots of *Rhododendron lochiaie* (Ericaceae) in an Australian tropical cloud forest revealed by culturing and culture-independent molecular methods. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1743–1754, 2005.

BOYLE, C. et al. Endophyte-host interactions III. Local vs. systemic colonization. **Symbiosis**, v. 31, n. 4, p. 259–281, 2001.

BRAMORSKI, A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha) grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2134–2138, 2011.

BRESOLIN, A. Flora da Restinga da Ilha de Santa Catarina. **Insula**, v.10, p. 1-55, 1979.

BREVIS, P. A. et al. Production and viability of pollen and pollen-ovule ratios in four rabbiteye blueberry cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 131, n. 2, p. 181–184, 2006.

BRIGGS, C. L.; ASHFORD, A. E. Structure and composition of the thick wall in hair root epidermal cells of *Woollisia pungens*. **New Phytologist**, v. 149, n. 2, p. 219–232, 2001.

BRUNDRETT, M. Diversity and classification of mycorrhizal associations. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 79, n. 3, p. 473–495, 2004.

BRUZONE, M. C. et al. First record of *Rhizoscyphus ericae* in Southern Hemisphere's Ericaceae. **Mycorrhiza**, v. 27, p. 147–163, 2017.

BRUZONE, M. C.; FONTENLA, S. B.; VOHNÍK, M. Is the prominent ericoid mycorrhizal fungus *Rhizoscyphus ericae* absent in the Southern Hemisphere's Ericaceae? A case study on the diversity of root mycobionts in *Gaultheria* spp. from northwest Patagonia, Argentina. **Mycorrhiza**, n. 25, p. 25–40, 2015.

BUCHMANN, S. L.; HURLEY, J. P. A biophysical model for buzz pollination in angiosperms. **Journal of Theoretical Biology**, v. 72, n. 4, p. 639–657, 1978.

CAIRNEY, J. W. G.; ASHFORD, A. E. Biology of mycorrhizal associations of epacrids (Ericaceae). **New Phytologist**, v. 154, n. 135, p. 305–326, 2002.

CANE, J. H.; EICKWORT G. C.; WESLEY F.R.; J. SPIELHOLZ Pollination ecology of *Vaccinium stamineum* (Ericaceae: Vaccinioideae) **American Journal of Botany**, v. 72, p. 135–142, 1985.

CANE, J. H.; PAYNE, J. A. Foraging ecology of the bee *Habropoda laboriosa* (Hymenoptera: Anthophoridae), an oligolege of blueberries (Ericaceae: *Vaccinium*) in the southeastern United States. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 81, n. 3, p. 419–427, 1988.

CANNON, K. D. Natural history notes for *Aellopus ceculos* (Cameron) (Sphingidae) in Northeastern Costa Rica. **Journal of the Lepidopterist Society**, v. 39, n. 4, p. 330–333, 1985.

CARRASCO, P. G. et al. **Produção e avaliação do crescimento de mudas de espécies florestais de Restinga, com e sem adubação**. 3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente. Anais. Bento Gonçalves: 2012. Disponível em: <<http://www.proamb.com.br/downloads/27awv5.pdf>>

CASTELLANI, T. T. **Estrutura e dinâmica populacional de *Ipomoea pescaprae* (L.) R. Brown (Convolvulaceae) na Ilha de Santa Catarina.** 2003. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CECCA - Centro de Estudos Cultura e Cidadania. Uma cidade numa ilha: relatório sobre os problemas sócio-ambientais da Ilha de Santa Catarina. **Insular**, 1996.

CECCA - Centro de Estudos Cultura e Cidadania. Unidades de conservação e áreas protegidas da Ilha de Santa Catarina: caracterização e legislação. **Insular**, 1997.

CESTARI, C.; PIZO, M. A. Frugivory by the white-bearded manakin (*Manacus manacus*, Pipridae) in Restinga forest, an ecosystem associated to the Atlantic forest. **Biota Neotrop.**, v. 13, n. 2, p. 345–350, 2013.

CHAMBERS, S. M.; LIU, G.; CAIRNEY, J. W. G. ITS rDNA sequence comparison of ericoid mycorrhizal endophytes from *Woollisia pungens*. **Mycol. Res.**, v. 104, n. February, p. 168–174, 2000.

CHAZDON, R. L. et al. Beyond Reserves: A research agenda for conserving biodiversity in human-modified tropical landscapes. **Biotropica**, v. 41, n. 2, p. 142–153, 2009.

CHIN, H. F.; KRISHNAPILLAY, B. **Seed Moisture**: Recalcitrant vs. Orthodox Seeds. In: STANWOOD, P.C.; MCDONALD, M. B. (Eds.). Seed moisture. CSSA Speci ed. Madison: Crop Science Society of America, 1989. p. 15–22.

CNCFlora - CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA: **Lista Vermelha**, 2017. Disponível em: <<http://cncflora.jbrj.gov.br/porta1/pt-br/listavermelha/ERICACEAE>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

COMBÈS, A. et al. Chemical communication between the endophytic fungus *Paraconiothyrium variabile* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

CONAMA. Resolução n.º 07, de 23 de julho de 1996. Define estágios de sucessão de vegetação de Restinga, no estado de São Paulo. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n. 165, p. 16386-16390, 26 ago. 1996. Seção 1.

CONAMA. Resolução n.º 423, de 12 de abril de 2010. Dispõe sobre parâmetros básicos para identificação e análise da vegetação primária e dos estágios sucessionais da vegetação secundária nos Campos de Altitude associados ou abrangidos pela Mata Atlântica. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n. 69, p. 55-57, 13 abr. 2010.

CONAMA. Resolução n.º 447, de 30 de dezembro de 2011. Aprova a lista de espécies indicadoras dos estágios sucessionais de vegetação de Restinga para o Estado do Paraná. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n. 2, p. 130-132, 03 jan. 2012.

CONNER, J. K. Ecological genetics of floral evolution. In: HARDER, L. D.; BARRETT, S. C. H. (Eds.). **Ecology and evolution of flowers**. New York: Oxford University Press, 2006. p. 260–277.

CONTRERAS, H. L. et al. The effect of ambient humidity on the foraging behavior of the hawkmoth *Manduca sexta*. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 199, n. 11, p. 1053–1063, 2013.

CORDOBA, A. S. et al. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi along a sand dune stabilization gradient: a case study at Praia da Joaquina, Ilha de Santa Catarina, South Brazil. **Mycoscience**, v. 42, n. 4, p. 379–387, 2001.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; KNOLL, F. R. N.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. I. Nicho trófico e abundância de *Bombus morio* e *Bombus atratus* em diferentes biomas brasileiros. **Apoidea neotropica**, v. Homenagem, p. 285–295, 2003.

COSTA, J. et al. Variation in the incompatibility reactions in tristylous *Oxalis pes-caprae*: large-scale screening in South African native and Mediterranean basin invasive populations. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 24, n. 2, p. 35–35, 2017.

CRUDEN, R. W. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution**, v. 31, p. 32–46, 1977.

CRUZ-NETO, O. et al. Synchronous phenology of hawkmoths (Sphingidae) and *Inga* species (Fabaceae-Mimosoideae): implications for the restoration of the Atlantic forest of northeastern Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 20, n. 4, p. 751–765, 2011.

CRUZ-NETO, O. et al. The influence of nectar production and floral visitors on the female reproductive success of *Inga* (Fabaceae): A field experiment. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, n. 2, p. 230–245, 2015.

CULLINGS, K. W. Single phylogenetic origin of ericoid mycorrhizae within the Ericaceae. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, p. 1896–1909, Dec. 1996.

DAFNI, A. **Pollination Ecology: a practical approach**. New York: Oxford University Press Inc., 1992.

DAWSON, I. K. et al. What is the relevance of smallholders' agroforestry systems for conserving tropical tree species and genetic diversity in *circa situm*, *in situ* and *ex situ* settings? A review. **Biodiversity and Conservation**, v. 22, n. 2, p. 301–324, 2013.

DIGHTON, J. **Fungi in Ecosystem Processes**. New York: Marcel Dekker Inc., 2003.

DIXON, K. W.; SIVASITHAMPARAM, K.; READ, D. J. Ericoid mycorrhizas in plant communities. In: SIVASITHAMPARAM, K.; K. W., D.; BARRETT, L. P. (Eds.). **Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 227–240.

DRECHSEL, U. The early stages of *Aellopos clavipes* (Rothschild & Jordan, 1903) (Sphingidae: Macroglossinae). **Paraguay Biodiversidad**, v. 1, n. 14, p. 70–74, 2014.

DUDDRIDGE, J.; READ, D. J. An ultrastructural analysis of the development of mycorrhizas in *Rhododendron ponticum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, n. 11, p. 2345–2356, 1982.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew, England: Commonwealth Mycological Institute, 1971.

ELLIS, M. B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew, England: Commonwealth Mycological Institute, 1976.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. **Handbook of seed technology for genebanks: volume I. principles and methodology**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, IT, 1985a.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. **Handbook of seed technology for genebanks: volume II. Compendium of specific germination information and test recommendations**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, IT, 1985b.

ERNST, M.; MENDGEN, K. W.; WIRSEL, S. G. R. Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 16, n. 7, p. 580–7, 2003.

FAO - Food and Agriculture organization of the United Nations. FAO's role in biodiversity. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/biodiversity/en/>>. Acesso em 30 novembro 2017.

FRANÇOSO, E. et al. Comparative phylogeography in the Atlantic forest and Brazilian savannas: pleistocene fluctuations and dispersal shape spatial patterns in two bumblebees. **BMC Evolutionary Biology**, v. 16, n. 1, p. 267, 2016.

FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5104, p. 75–8, 1993.

FREITAS, L.; GALETTO, L.; SAZIMA, M. Pollination by hummingbirds and bees in eight syntopic species and a putative hybrid of Ericaceae in Southeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 258, n. 1–2, p. 49–61, 2006.

FUKUCHI, S.; OBASE, K. Vegetation and colonization status of

mycorrhizal and endophytic fungi in plant species on acidic barren at crater basin of volcano Esan in Hokkaido, Japan. **Eurasian Journal of Forest Research**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2011.

GALEN, C.; PLOWRIGHT, R. C. Testing the accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. **Botany**, v. 65, n. 1, p. 107–111, 1987.

GANDOLFO, E. S.; HANAZAKI, N. Distribution of local plant knowledge in a recently urbanized area (Campeche District, Florianópolis, Brazil). **Urban Ecosystems**, 19 Jan. 2014.

GENRE, A. et al. Multiple exocytotic markers accumulate at the sites of perifungal membrane biogenesis in arbuscular mycorrhizas. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 1, p. 244–255, 2012.

GENTRY, A. H. Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between central and south america, pleistocene climatic fluctuations, or an accident of the andean arogeny? **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 69, p. 557–593, 1982.

GOMES, M. A. F.; PEREIRA, L. C. **Áreas Frágeis no Brasil: subsídios à legislação ambiental**. Jaguariúna, SP: [s.n.].

GORZELAK, M. A.; HAMBLETON, S.; MASSICOTTE, H. B. Community structure of ericoid mycorrhizas and root-associated fungi of *Vaccinium membranaceum* across an elevation gradient in the Canadian Rocky Mountains. **Fungal Ecology**, v. 5, n. 1, p. 36–45, Feb. 2012.

GREIF, M. D.; CURRAH, R. S. Development and dehiscence of the cephalothecoid peridium in *Aporothielavia leptoderma* shows it belongs in Chaetomidium. **Mycological Research**, v. 111, n. 1, p. 70–77, 2007.

GRELET, G. A. et al. New insights into the mycorrhizal *Rhizoscyphus ericae* aggregate: Spatial structure and co-colonization of ectomycorrhizal and ericoid roots. **New Phytologist**, v. 188, n. 1, p. 210–222, 2010.

GUIMARÃES, T. DE B. **Florística e fenologia reprodutiva de plantas vasculares na Restinga do Parque Municipal das Dunas da Lagoa de Conceição, Florianópolis, SC**. Dissertação (Mestrado em Biologia

Vegetal) – Departamento de Biologia. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

HADLEY, A. S. et al. Forest fragmentation and loss reduce richness, availability, and specialization in tropical hummingbird communities. **Biotropica**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2017.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HAMBLETON, S.; CURRAH, R. S. Fungal endophytes from the roots of alpine and boreal Ericaceae. **Canadian Journal of Botany**, v. 75, p. 1570–1581, 1997.

HAMBLETON, S.; SIGLER, L. *Meliniomyces*, a new anamorph genus for root-associated fungi with phylogenetic affinities to *Rhizoscyphus ericae* (\equiv *Hymenoscyphus ericae*), Leotiomycetes. **Studies in Mycology**, v. 53, p. 1–27, 2005.

HANLIN, R. T. **Illustrated Genera of Ascomycetes**. St. Paul, MN: APS Press, 1989.

HANSEN, T. F. Epigenetics: Adaptation or Contingency? In: HALLGRÍMSSON, B.; HALL, B. K. (Eds.). **Epigenetics: linking genotype and phenotype in development and evolution**. Berkeley: University of California Press, p. 357–376, 2011.

HARLEY J. L. **The biology of mycorrhiza**. London: Leonard Hill, 1959.

HAY, F. R.; PROBERT, R. J. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. **Conservation Physiology**, v. 1, n. 1, p. 1–11, 2013.

HAZARD, C. et al. Diversity of fungi associated with hair roots of ericaceous plants is affected by land use. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 87, n. 3, p. 586–600, 2014.

HEALD, F. D. Symptoms of chestnut blight and a brief description of the blight fungus: **Pennsylvania chestnut tree blight commission**. Philadelphia: Bulletin n. 5, 1913.

HEDRICK, T. L. Flight control in the hawkmoth *Manduca sexta*: the inverse problem of hovering. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 16, p. 3114–3130, 2006.

HERBARIUM ANCHIETA (PACA-AGP), 2016. INCT - **Herbário Virtual da Flora e dos Fungos**. Disponível em: <<http://inct.splink.org.br>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

HIBBETT, D. et al. Sequence-based classification and identification of Fungi. **Mycologia**, v. 108, n. 6, p. 1049–1068, 2016.

HIBBETT, D. S. et al. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 38–47, 2011.

HOPKINS, W. G. **Plant development**. Philadelphia: Chelsea House, 2005.

INOUE, K. Evolution of mutualism in plant pollinator interactions on islands. **Journal of Biosciences**, v. 18, n. 4, p. 525–536, 1993.

JAMES, S. Lignotubers and Burls-Their Structure, Function and Ecological Significance in Mediterranean Ecosystems. **The Botanical Review**, v. 50, n. 3, p. 225–266, 1984.

JAVOREK, S. K.; MACKENZIE, K. E.; VANDER KLOET, S. P. Comparative Pollination Effectiveness Among Bees (Hymenoptera: Apoidea) on Lowbush Blueberry (Ericaceae: *Vaccinium angustifolium*). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 95, n. 2, p. 345–351, 2001.

JOSENS, R. B.; FARINA, W. M. Nectar feeding by the hovering hawk moth *Macroglossum stellatarum*: Intake rate as a function of viscosity and concentration of sucrose solutions. **Journal of Comparative Physiology - A Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 187, n. 8, p. 661–665, 2001.

JUMPPONEN, A. Dark septate endophytes: are they mycorrhizal? **Mycorrhiza**, v. 11, n. 4, p. 207–211, 2001.

JUMPPONEN, A.; MATTSON, K. G.; TRAPPE, J. M. Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: Interactions with soil nitrogen and organic matter. **Mycorrhiza**, v. 7, n. 5, p. 261–265, 1998.

JUMPPONEN, A.; TRAPPE, J. M. Dark septate endophytes: A review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. **New Phytologist**, v. 140, n. 2, p. 295–310, 1998.

JUST, M. **Seed morphology , dormancy and germination of South-West Australian Ericaceae**. [Dissecação de Mestrado em Ciências Biológicas] Cowan University, Australia, 2018.

KAMINSKYJ, S. G. W. Effective and flexible methods for visualizing and quantifying endorhizal fungi. In: SIDDIQUI, Z. A.; AKHTAR, M. S.; FUTAI, F. (Eds.). **Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry**. Dordrecht: Springer-Verlag, 2008. p. 337–349.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. Niwot: University Press of Colorado, 1993.

KELBER, A. Colour learning in the hawkmoth *Macroglossum stellatarum*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 1127–1131, 1996.

KELBER, A. Innate preferences for flower features in the hawkmoth *Macroglossum stellatarum*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 200, n. Pt 4, p. 827–36, 1997.

KELBER, A. Sugar preferences and feeding strategies in the hawkmoth *Macroglossum stellatarum*. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 189, n. 9, p. 661–666, 2003.

KERLEY, S. J.; READ, D. J. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. **New Phytologist**, v. 131, p. 369–375, 1995.

KERN, R.; VARJÚ, D. Visual position stabilization in the hummingbird hawk moth, *Macroglossum stellatarum* L. **Journal of Comparative Physiology**, v. 182, p. 225–237, 1998.

KIRK, P. M. et al. **Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi**. 10. ed. Wallingford: CAB International, 2008.

KJØLLER, R.; OLSRUD, M.; MICHELSEN, A. Co-existing ericaceous plant species in a subarctic mire community share fungal root endophytes. **Fungal Ecology**, v. 3, n. 3, p. 205–214, Aug. 2010.

KLEIN, R. M. **Mapa Fitogeográfico do Estado de Santa Catarina**. Itajaí: IOESC, 1978. 24 p.

KNUDSEN, J. T.; OLESEN, J. M. Buzz-pollination and patterns in sexual traits in North European Pyrolaceae. **American journal of botany**, v. 80, n. 8, p. 900–913, 1993.

KOHLER, G. U. **Redes de interação planta-beija-flor em um gradiente altitudinal de Floresta Atlântica no sul do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2011.

KOHOUT, P. Biogeography of ericoid mycorrhiza. **Ecological Studies**. v. 230, p. 179–193, 2017.

KOSKE, R. E.; GEMMA J. N.; ENGLANDER, L. Vesicular arbuscular mycorrhizae in Hawaiian Ericales. **American Journal of Botany**. v. 77, n., p. 64-68, 1990.

KOTTEK, M. et al. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 15, n. 3, p. 259–263, 2006.

KRAEMER, M. On the pollination of *Bejaria resinosa* Mutis ex Linné f. (Ericaceae), an ornithophilous Andean páramo shrub. **Flora (Germany)**, v. 196, n. 1, p. 56–62, 2001.

KRON, K. A. et al. Phylogenetic Classification of Ericaceae : Molecular and Morphological Evidence. **The Botanical Review**, v. 68, n. 3, p. 335–423, 2002.

KRON, K. A.; LUTEYN, J. L. Origins and biogeographic patterns in Ericaceae: New insights from recent phylogenetic analyses. **Biol Skr. (Plant diversity and complexity patterns: local regional and global**

dimensions: Proceedings of an International Symposium held at the Royal Danish Academy of Sciences, v. 1, n. December, p. 479–500, 2005.

KRON, K. A.; POWELL, E. A.; LUTEYN, J. L. Phylogenetic relationships within the blueberry tribe (Vaccinieae, Ericaceae) based on sequence data from MATK and nuclear ribosomal ITS regions, with comments on the placement of Satyria. **American journal of botany**, v. 89, n. 2, p. 327–36, Feb. 2002.

LANDE, R. Genetics and demography in biological conservation. **Science**, v. 241, n. 4872, p. 1455–1460., 1988.

LAROCA, S. N. **Ecologia: princípios e métodos**. Petrópolis: Vozes, 1995.

LEAKE, J. R.; MILES, W. Phosphodiesterase as mycorrhizal P sources: I. Phosphodiesterase production and the utilization of DNA as a phosphorus source by the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae*. **New Phytologist**, v. 132, n. 3, p. 435–443, 1996.

LEAKE, J. R.; READ, D. J. Experiments with ericoid mycorrhiza. **Methods in Microbiology**, v. 23, n. C, p. 435–459, 1991.

LEAKE, J. R.; SHAW, G.; READ, D. J. The role of ericoid mycorrhizas in the ecology of ericaceous plants. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 29, p. 237–250, 1989.

LENZI, M.; MATOS, J. Z. DE; ORTH, A. I. Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E . Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae). **Acta bot. bras.**, v. 20, n. 2, p. 487–500, 2006.

LEOPOLD, D. R. Ericoid fungal diversity: Challenges and opportunities for mycorrhizal research. **Fungal Ecology**, v. 24, p. 114–123, 2016.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory manual**. Ames, USA: Blackwell Publishing, 2006.

LI, W. et al. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W580–W584, 2015.

LINDAHL, B. D. et al. Fungal community analysis by high-throughput

sequencing of amplified markers - a user's guide. **New Phytologist**, v. 199, n. 1, p. 288–299, 2013.

LIU, L. et al. Brasilamides A-D: Sesquiterpenoids from the plant endophytic fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 10, n. 17, p. 3302–3306, 2010.

LORBERAU, K. E. et al. Does warming by open-top chambers induce change in the root-associated fungal community of the arctic dwarf shrub *Cassiope tetragona* (Ericaceae)? **Mycorrhiza**, v. 27, p. 513–524, 2017.

LUKESOVA, T. et al. The potential of dark septate endophytes to form root symbioses with ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal middle european forest plants. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–26, 2015.

LUTEYN, J. L. Diversity, adaptation, and endemism in neotropical ericaceae: biogeographical patterns in the Vaccinieae. **The Botanical Review**, v. 68, n. 1, p. 55–87, 2002.

LUTEYN, J. L.; SYLVA S, D. S. “Murri” (Antioquia Department, Colombia): hotspot for neotropical blueberries (Ericaceae : Vaccinieae). **Brittonia**, v. 51, n. 3, p. 280–302, 1999.

LUTEYN, J. L.; PEDRAZA-PEÑALOSA P. **Blueberry relatives of the New World tropics (Ericaceae)** (<http://sweetgum.nybg.org/ericaceae/index.php>). Bronx, New York: The New York Botanical Garden, 2012.

MANAMGODA, D. S. et al. *Cochliobolus*: An overview and current status of species. **Fungal Diversity**, v. 51, n. December, p. 3–42, 2011.

MANHÃES, M. A. Dieta de traupíneos (Passeriformes, Emberizidae) no Parque Estadual do Ibitipoca , Minas Gerais , Brasil. **Iheringia, Sé. Zool.**, v. 93, n. 1, p. 59–73, 2003.

MARCHI, P.; ALVES-DOS-SANTOS, I. As abelhas do gênero *Xylocopa latreille* (Xylocopini , Apidae) do Estado de São Paulo , Brasil. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 2, p. 249–269, 2013.

MARQUES, M. C. M.; KLEIN, R. M. Ericáceas. Parte I. In: R. Reitz (Ed.). **Flora Ilustrada Catarinense**. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí,

p. 01-63, 1975.

MARTIN, F. W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technology**, v. 34, p.125-128, 1959.

MASSICOTTE, H. B. et al. Structure and histochemistry of mycorrhizae synthesized between *Arbutus menziesii* (Ericaceae) and two basidiomycetes, *Pisolithus tinctorius* (Pisolithaceae) and *Piloderma bicolor* (Corticaceae). **Mycorrhiza**, v. 3, p. 1–11, 1993.

MASSICOTTE, H. B.; MELVILLE, L. H.; PETERSON, R. L. Structural characteristics of root–fungal interactions for five ericaceous species in eastern Canada. **Canadian Journal of Botany**, v. 83, n. 8, p. 1057–1064, 2005.

MATSUDA, Y. et al. Seasonal and environmental changes of mycorrhizal associations and heterotrophy levels in mixotrophic *Pyrola japonica* (Ericaceae) growing under different light environments. **American journal of botany**, v. 99, n. 7, p. 1177–88, Jul. 2012.

MAYER, C. et al. The abundance and pollen foraging behaviour of bumble bees in relation to population size of whortleberry (*Vaccinium uliginosum*). **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e50353, 2012.

MCKECHNIE, I. M.; BURTON, P. J.; MASSICOTTE, H. B. **Propagation and fungal inoculation of black huckleberry and velvet-leaf blueberry: how can these species be used in ecological reclamation?** Prince Geoge, Canadá: NRESi Research Extension Note n. 5, 2009.

MCLEAN, C. B. et al. First synthesis of ericoid mycorrhizas in the Epacridaceae under axenic conditions. **New Phytologist**, v. 139, n. 3, p. 589–593, 1998.

MCLEAN, C.; CUNNINGTON, J. H.; LAWRIE, A. C. Molecular ericoid diversity within from the and between Ericaceae and endophytes Epacridaceae. **New Phytologist**, v. 144, p. 351–358, 1999.

MCMULLAN-FISHER, S. J. M. et al. Fungi and fire in Australian ecosystems: A review of current knowledge, management implications and future directions. **Australian Journal of Botany**, v. 59, n. 1, p. 70–

90, 2011.

MIBUS, R.; SEDGLEY, M. Early *lignotuber* formation in banksia—investigations into the anatomy of the cotyledonary node of two banksia (Proteaceae) species. **Annals of Botany**, v. 86, p. 575–587, 2000.

MIDGLEY, D. J.; CHAMBERS, S. M.; CAIRNEY, J. W. G. Distribution of ericoid mycorrhizal endophytes and root-associated fungi in neighbouring Ericaceae plants in the field. **Plant and Soil**, v. 259, n. 1–2, p. 137–151, 2004.

MITCHELL, D. T.; GIBSON, B. R. Ericoid mycorrhizal association: ability to adapt to a broad range of habitats. **Mycologist**, v. 20, n. 1, p. 2–9, 2006.

MITCHELL, R. J. et al. Ecology and evolution of plant-pollinator interactions. **Annals of Botany**, v. 103, n. 9, p. 1355–1363, 2009.

MÖLLER, E. M. et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 22, p. 6115–6116, 1992.

MORAES, A. C. DA S. **Fenologia, síndromes de polinização e dispersão e potencial hídrico de espécies lenhosas de Cerrado, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Botânica) – Pós-graduação em Botânica Universidade Estadual de Feira de Santana, 2011.

MOREIRA, M. M.; MIRANDA, A. S.; LIMA, H. A. DE. *Agarista revoluta* (Ericaceae): A generalist plant with self-compatible and self-incompatible individuals. **Flora**, v. 234, p. 7–14, 2017.

MUSAVI, S. F.; BALAKRISHNAN, R. M. Biodiversity, antimicrobial potential, and phylogenetic placement of an endophytic *Fusarium oxysporum* NFX 06 isolated from Nothapodytes foetida. **Journal of Mycology**, v. 2013, n. December, p. 1–10, 2013.

NAVARRO, L. Pollination ecology and effect of nectar removal in *Macleania bullata* (Ericaceae). **Biotropica**, v. 31, n. 4, p. 618–625, 1999.

NAVARRO, L.; AYENSA, G.; GUITIÁN, P. Adaptation of floral traits and mating system to pollinator unpredictability: the case of *Disterigma stereophyllum* (Ericaceae) in southwestern Colombia. **Plant Systematics and Evolution**, v. 266, n. 3–4, p. 165–174, 30 May 2007.

NAVARRO, L.; GUITIÁN, P.; AYENSA, G. Pollination ecology of *Disterigma stereophyllum* (Ericaceae) in south-western Colombia. **Plant Biology**, v. 10, n. 4, p. 512–518, 2008.

NAVARRO, L.; MEDEL, R. Relationship between floral tube length and nectar robbing in *Duranta erecta* L. (Verbenaceae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 96, n. 2, p. 392–398, 21 Jan. 2009.

NATURESERVE. NatureServe Explorer: **An online encyclopedia of life** [web application Version 7.1.]. 2017. NatureServe, Arlington, Virginia. Disponível em: <<http://explorer.natureserve.org/servlet/NatureServe?searchSciOrCommonName=gaylussacia&x=11&y=5>>. Acesso em: 29 junho 2017.

NCBI - National Center for Biotechnology Information . **Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information;** [1988]. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome>. Acesso em : 30 setembro de 2017.

NEWSHAM, K. K. First record of intracellular sporulation by a coelomycete fungus. **Mycological Research**, v. 98, n. 12, p. 1390–1392, 1994.

NGUYEN, A. T.; HAN, J.-S.; HAN, J.-H. Effect of body aerodynamics on the dynamic flight stability of the hawkmoth *Manduca sexta*. **Bioinspiration & Biomimetics**, v. 12, n. 1, p. 16007, 2016.

NGUYEN, N. H. et al. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. **Fungal Ecology**, n. October, p. 1–8, 2015.

NIRENBERG, H. I.; METZLER, B. Identification of *Penicillium* species isolated from an agricultural loess soil in Germany. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Eds.). **Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus***

classification. NATO Advanced Science Institutes Series A, Life sciences ; 185. New York: Springer Science+Business Media, 1990. p. 193–198.

O'DELL, T. E.; MASSICOTTE, H. B.; TRAPPE, J. M. Root colonization of *Lupinus latifolius* Agardh. and *Pinus contorta* Dougl. by *Phialocephala fortinii* Wang & Wilcox. **New Phytologist**, v. 124, n. 1, p. 93–100, 1993.

OBASE, K.; MATSUDA, Y.; ITO, S. ICHIRO. *Enkianthus campanulatus* (Ericaceae) is commonly associated with arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v. 23, n. 3, p. 199–208, 2013.

OBASE, K. et al. Culturable fungal assemblages growing within *Cenococcum sclerotia* in forest soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 90, n. 3, p. 708–717, 2014.

OBERWINKLER, F. et al. Enigmatic Sebaciniales. **Mycological Progress**, v. 12, n. 1, p. 1–27, 4 Jan. 2013.

ORDONEZ, J. C. et al. Constraints and opportunities for tree diversity management along the forest transition curve to achieve multifunctional agriculture. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 6, p. 54–60, Feb. 2014.

PEARSON, V.; READ, D. J. The biology of mycorrhiza in the ericaceae. **New Phytologist**, v. 72, p. 1325–1331, 1973.

PÉLABON, C. et al. Decoupled phenotypic variation between floral and vegetative traits: distinguishing between developmental and environmental correlations. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 935–944, 2013.

PEREIRA, M. J. Reproductive biology of *Vaccinium cylindraceum* (Ericaceae), an endemic species of the Azores archipelago. **Botany**, v. 86, n. 4, p. 359–366, 2008.

PEROTTO, S. et al. Ericoid mycorrhizal fungi: cellular and molecular bases of their interactions with the host plant. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. S1, p. 557–568, 1995.

PEROTTO, S. et al. Molecular diversity of fungi from ericoid mycorrhizal roots. **Molecular ecology**, v. 5, p. 123–131, 1996.

PETERSON, R. L.; MASSICOTTE, H. B.; MELVILLE, L. H. **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. Ottawa: CAB International, 2004.

PETERSON, R. L.; WAGG, C.; PAUTLER, M. Associations between microfungus endophytes and roots: do structural features indicate function? **Botany**, v. 86, n. 5, p. 445–456, 2008.

PETRI, J. L. Número de grãos de pólen por antera em diversas cultivares de macieira (*Malus sylvestris*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Campinas: SBF, p. 467-471, 1976.

PLATTNER, I.; HALL, I. Parasitism of non-host plants by the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. **Mycological Research**, v. 99, n. 11, p. 1367–1370, 1995.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 291–315, 2011.

RAINS, K. C.; NADKARNI, N. M.; BLEDSOE, C. S. Epiphytic and terrestrial mycorrhizas in a lower montane Costa Rican cloud forest. **Mycorrhiza**, v. 13, n. 5, p. 257–264, 2003.

RAPER, K.; THOM, C. **A manual of the penicillia**. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1949.

READ, D. J. The biology of mycorrhiza in the Ericales. **Canadian Journal of Botany**, v. 61, 985-1004, 1983.

READ, D. J. The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. **Annals of Botany**, v. 77, n. 4, p. 365–374, 1996.

REITZ, P. R. Vegetação da zona marítima de Santa Catarina. **Sellowia**. Itajaí, n.13, p.17-117, 1961.

RIVERA, K. G.; SEIFERTKEITH, K. A. A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. **Studies in Mycology**,

v. 70, p. 139–158, 2011.

RODRIGUES, L. DA C. **Beija-flores e seus recursos florais em uma área de campo rupestre: composição de espécies, sazonalidade e rede de interações.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

RODRIGUES, R. A. F. et al. Antiproliferative activity, isolation and identification of active compound from *Gaylussacia brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 622–626, Aug. 2011.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. **ISME Journal**, v. 2, n. 4, p. 404–416, 2008.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New phytologist**, v. 182, n. 2, p. 314–330, 2009.

ROJAS-NOSSA, S. V.; SÁNCHEZ, J. M.; NAVARRO, L. Nectar robbing: a common phenomenon mainly determined by accessibility constraints, nectar volume and density of energy rewards. **Oikos**, v. 125, n. 7, p. 1044–1055, 2016.

ROMÃO, G. O. **Revisão taxonômica de *Gaylussacia* Kunth (Ericaceae) e estudos da filogenia do gênero.** Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2011.

ROMÃO, G. O.; KINOSHITA, L. S. Novidades taxonômicas em Ericaceae para o Brasil: uma nova espécie para *Gaylussacia* e uma combinação nova para *Gaultheria*. **Rodriguésia**, v. 61, n. Sup., p. 51–55, 2010.

ROSE SELWIN, A. E.; SENTHILKUMAR, S. Studies on the mycorrhizal association of *Rhododendron arboreum* Sm. ssp *nilagiricum* (Zenker) Tagg. **Tropical ecology**, v. 57, n. 1, p. 69–76, 2016.

SAKAKIBARA, S. M. et al. A comparison of ectomycorrhiza identification based on morphotyping and PCR-RFLP analysis. **Mycological Research**, v. 106, n. 8, p. 868–878, 2002.

SANTOS, E.; HEBERLE D. A.; LOVATO, P. E. Germinação de sementes de *Gaylussacia brasiliensis* (SPR.) Meissner. In: II SIMPÓSIO

INTERNACIONAL DE CIÊNCIA, SAÚDE E TERRITÓRIO. Lages. Resumos, 2013.

SANTOS, E.; HEBERLE D. A.; LOVATO, P. E. Desenvolvimento de técnicas de multiplicação da *Gaylussacia brasiliensis* (SPR.) Meissner. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, Joinville. Resumos, 2011.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.

SCHOCH, C. L. et al. Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for fungi. **Database : the journal of biological databases and curation**, v. 2014, p. 1–21, 2014.

SCHULZ, B. et al. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. **Mycol. Res.**, v. 103, n. 10, p. 1275–1283, 1999.

SCHULZ, B. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996–1004, 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic *continuum*. **Mycological research**, v. 109, n. Pt 6, p. 661–686, 2005.

SCHULZ, B. J. E.; BOYLE, C. J. C.; SIEBER, T. N. **Microbial Root Endophytes**. Heidelberg: Springer, 2006.

SELOSSE, M.-A.; BAUER, R.; MOYERSON, B. Basal hymenomycetes belonging to the Sebacinaceae are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees. **New Phytologist**, v. 155, p. 183–195, 2002.

SELOSSE, M. A. et al. Sebacinales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. **New Phytologist**, v. 174, n. 4, p. 864–78, Jan. 2007.

SETARO, S. et al. Sebacinales form ectomycorrhizas with *Cavendishia nobilis*, a member of the Andean clade of Ericaceae, in the mountain rain forest of southern Ecuador. **The New phytologist**, v. 169, n. 2, p. 355–65, Jan. 2006.

SETARO, S.; KOTTKE, I.; OBERWINKLER, F. Anatomy and ultrastructure of mycorrhizal associations of neotropical Ericaceae. **Mycological Progress**, v. 5, n. 4, p. 243–254, 2006.

SETARO S. D.; KRON K. Neotropical and North American Vaccinioideae (Ericaceae) share their mycorrhizal Sebaciales—an indication for concerted migration? PLOS Currents: Tree of Life. 2011, doi:10.1371/currents.RRN1227.

SHARPLES, J. M. et al. Genetic diversity of root-associated fungal endophytes from *Calluna vulgaris* at contrasting field sites. **New Phytologist**, v. 148, p. 153–162, 2000.

SHIONO, Y. et al. Isopimarane diterpene glycosides, isolated from endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. MY-42. **Phytochemistry**, v. 72, n. 11–12, p. 1400–1405, 2011.

SILVA, R. R.; CERVI, A. C. As Ericaceae Juss. nativas no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Biol Par.**, v. 35, p. 1–45, 2006.

SMITH S. E.; READ D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2. ed. London: Academic Press, 2008.

SOHN, K.; YOON, K. Ultrastructural study on the cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. **Mycobiology**. v. 30, n. 3 p. 117–127, 2002.

SOUZA-FAGUNDES, E. M. et al. Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1207–12, Dec. 2002.

STEPHENS, D. T.; LEVESQUE, D. E.; DAVIS, A. R. Pollen-ovule ratios in seven species of *Vaccinium* (Ericaceae) and stamen structure in *Vaccinium myrtilloides* and *Vaccinium vitis-idaea*. **Botany**, v. 90, n. 7, p. 599–614, 2012.

STERFLINGER, K. Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. In: ROSA, C.; PÉTER, G. (Eds.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Heidelberg, Berlin: Springer Berlin, 2006. p. 500–514.

STIELOW, J. B. et al. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, n. 1, p. 242–263, 2015.

STOYKE, G.; CURRAH, R. Resynthesis in pure culture of a common subalpine fungus-root association using *Phialocephala fortinii* and *Menziesia ferruginea* (Ericaceae). **Arctic and Alpine Research**, v. 25, n. 3, p. 189–193, 1993.

STÜRMER, S. L.; BELLEI, M. M. Composition and seasonal variation of spore populations of arbuscular mycorrhizal fungi in dune soils on the island of Santa Catarina, Brazil. **Canadian Journal of Botany**, v. 72, p. 359–363, 1994.

STÜRMER, S. L.; STÜRMER, R.; PASQUALINI, D. Taxonomic diversity and community structure of arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota) in three maritime sand dunes in Santa Catarina state, south Brazil. **Fungal Ecology**, v. 6, n. 1, p. 27–36, 2013.

TAN, Y. P. et al. Molecular phylogenetic analysis reveals six new species of *Diaporthe* from Australia. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 251–260, 2013.

TEDERSOO, L. et al. Standardizing metadata and taxonomic identification in metabarcoding studies. **GigaScience**, v. 4, n. August, p. 34, 2015.

TEDERSOO, L.; LINDAHL, B. Fungal identification biases in microbiome projects. **Environmental Microbiology Reports**, n. September, p. 1–20, 2016.

TIAN, W. et al. Diversity of culturable ericoid mycorrhizal fungi of *Rhododendron decorum* in Yunnan, China. **Mycologia**, v. 103, n. 4, p. 703–9, 2011.

TIAN, Y. et al. The fungal leaf endophyte *Paraconiothyrium variabile* specifically metabolizes the host-plant metabolome for its own benefit. **Phytochemistry**, v. 108, p. 95–101, 2014.

USUKI, F.; NARISAWA, K. Formation of structures resembling ericoid mycorrhizas by the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospira* within roots of *Rhododendron obtusum* var. *kaempferi*. **Mycorrhiza**, v. 15, n. 1, p. 61–64, 2005.

USUKI, F.; NARISAWA, K. A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospira*, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage. **Mycologia**, v. 99, n. 2, p. 175–184, 2007.

VÁGI, P. et al. Simultaneous specific in planta visualization of root-colonizing fungi using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Mycorrhiza**, v. 24, n. 4, p. 259–266, 2014.

VALENZUELA-ESTRADA, L. R. et al. Root anatomy, morphology, and longevity among root orders in *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae). **American Journal of Botany**, v. 95, n. 12, p. 1506–1514, 2008.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A. et al. Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. **New Phytologist**, v. 205, n. 4, p. 1406–1423, 2015.

VERDAGUER, D.; OJEDA, F. Root starch storage and allocation patterns in seeder and resprouter seedlings of two cape *Erica* (Ericaceae) species. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 8, p. 1189–1196, 2002.

VERDAGUER, D.; OJEDA, F. Evolutionary transition from resprouter to seeder life history in two *Erica* (Ericaceae) Species: Insights from Seedling Axillary Buds. **Annals of Botany**, v. 95, p. 593–599, 2005.

VERKLEY, G. J. M. et al. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. **Studies in Mycology**, v. 50, n. 2, p. 323–335, 2004.

VIBRANS, A. C.; McROBERTS, R. E.; LINGNER, D.V.; NICOLETTI, A. L.; MOSER, P. Extensão original e atual da cobertura florestal de Santa Catarina. In: VIBRANS, A. C.; SEVEGNANI, L.; GASPER, A. L.; LINGNER, D.V (Eds.). **Inventário florístico florestal de Santa Catarina: diversidade e conservação dos remanescentes florestais**. Blumenau: Edfurb. v.1. 435 p. 2012.

VIBRANS, A. C.; SEVEGNANI, L.; GASPER, A. L.; LINGNER, D.V. **Inventário florístico florestal de Santa Catarina: Floresta Ombrófila Mista**. Blumenau: Edfurb. v.3. 435 p. 2013a.

VIBRANS, A. C.; SEVEGNANI, L.; GASPER, A. L.; LINGNER, D.V. **Inventário florístico florestal de Santa Catarina: Floresta Ombrófila Densa**. Blumenau: Edfurb, v.4, p. 574, 2013b.

VOHNÍK, M. et al. Intracellular colonization of *Rhododendron* and *Vaccinium* roots by *Cenococcum geophilum*, *Geomyces pannorum* and *Meliniomyces variabilis*. **Folia Microbiologica**, v. 52, n. 4, p. 407–414, 2007.

VOHNÍK, M. et al. Novel root-fungus symbiosis in Ericaceae: sheathed ericoid mycorrhiza formed by a hitherto undescribed basidiomycete with affinities to Trechisporales. **PLoS one**, v. 7, n. 6, p. e39524, Jan. 2012.

VOHNÍK, M.; ALBRECHTOVÁ, J. The Co-occurrence and morphological continuum between ericoid mycorrhiza and dark septate endophytes in roots of six European *Rhododendron* species. **Folia Geobotanica**, v. 46, n. 4, p. 373–386, 2011.

VOHNÍK, M.; ALBRECHTOVÁ, J.; VOSÁTKA, M. The inoculation with *Oidiodendron maius* and *Phialocephala fortinii* alters phosphorus and nitrogen uptake, foliar C: N ratio and root biomass distribution in *Rhododendron* cv. Azurro. **Symbiosis**, v. 40, p. 87–96, 2005.

VRÅLSTAD, T.; FOSSHEIM, T.; SCHUMACHER, T. *Piceirhiza bicolorata* – the ectomycorrhizal expression of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate? **New Phytologist**, v. 145, p. 549–563, 2000.

VRÅLSTAD, T.; SCHUMACHER, T.; TAYLOR, A. F. S. Mycorrhizal synthesis between fungal strains of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and potential ectomycorrhizal and ericoid hosts. **New Phytologist**, v. 153, n. 1, p. 143–152, 2002.

WANG, X. W. et al. Phylogenetic reassessment of the *Chaetomium globosum* species complex. **Persoonia**, v. 36, p. 83–133, 2016a.

WANG, X. W. et al. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and

chaetomium-like fungi from indoor environments. **Studies in Mycology**, v. 84, p. 145–224, 2016b.

WATANABE, M. et al. Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2500–2504, 2011.

WEBER, R. W. S. et al. Brefeldin A production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue: a strategy for habitat conquest? **Mycological Research**, v. 108, n. 6, p. 662–671, 2004.

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**. New York: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WILLMOTT, A. P.; ELLINGTON, C. P. The mechanics of flight in the hawkmoth *Manduca sexta*: I. Kinematics of hovering and forward flight. **The Journal of experimental biology**, v. 200, p. 2705–22, 1997a.

WILLMOTT, A. P.; ELLINGTON, C. P. The mechanics of flight in the hawkmoth *Manduca sexta*: II. Aerodynamic consequences of kinematic and morphological variation. **The Journal of experimental biology**, v. 200, p. 2723–2745, 1997b.

WU, G.; ZENG, L. Measuring the kinematics of a free-flying hawk-moth (*Macroglossum stellatarum*) by a comb-fringe projection method. **Acta Mechanica Sinica/Lixue Xuebao**, v. 26, n. 1, p. 67–71, 2010.

WURZBURGER, N.; BLEDSOE, C. S. Comparison of ericoid and ectomycorrhizal colonization and ectomycorrhizal morphotypes in mixed conifer and pygmy forests on the northern California coast. **Canadian Journal of Botany**, v. 79, p. 1202–1210, 2001.

WYATT, T. T.; WÖSTEN, H. A. B.; DIJKSTERHUIS, J. Fungal spores for dispersion in space and time. In: **Advances in Applied Microbiology**. Burlington: Academic Press. v. 85p. 42–91.

YAHR, R.; SCHOCH, C. L.; DENTINGER, B. T. M. Scaling up discovery of hidden diversity in fungi: impacts of barcoding approaches. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1702, p. 1–11, 2016.

ZAFFARANO, P. L. et al. Sex in the PAC: a hidden affair in dark septate endophytes? **BMC evolutionary biology**, v. 11, n. 1, p. 282, 2011.

ZAMITH, R. L.; SCARANO, F. R. Produção de mudas de espécies das Restingas do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 1, p. 161–176, 2004.

ZHANG, Y. et al. Root-associated fungi of *Vaccinium carlesii* in subtropical forests of China: intra- and inter-annual variability and impacts of human disturbances. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 22399, 2016.

ZHAO, J. et al. Isolation and identification of black yeasts by enrichment on atmospheres of monoaromatic hydrocarbons. **Microbial Ecology**, v. 60, n. 1, p. 149–156, 2010.

APÊNDICE A - Cronograma e informações sobre as atividades de campo em biologia reprodutiva

Site	Data	Período	Atividades	Dados climáticos		
A3N	11 Nov 2014*	6:00 – 7:00h	Avaliação do néctar potencial em 24 horas; e néctar instantâneo Coleta e fotos de <i>Bombus morio</i>	Hora	Temperatura (°C)	
		8:00 – 11:00h		seco	úmido	
				8:00h	25	24
				9:00h	31	26
			11:00h	35	28	
A3N	06 Dez 2014	7:00 – 11:00h	Observação			
A1N	30 Dez 2014	9:00 – 11:00h	Obs.: 01 beija-flor <i>Amazilia fimbriata</i>	Temp.: 33,8 °C Vento: 30 km/h (NE) UR: 81%		
A1N	06 Jan 2015	7:00 – 11:00h	Observação			
A3N	15 Jan 2015	10:00 – 11:00h	Observação			
A3N	29 Jan 2015	7:00 – 11:00h	Obs.: <i>Aellopos ceculus</i> ; coleta de flores para morfologia	Temp.: 26,8 °C Vento: 20 km/h (NE) RH: 82%		
A3N	11 Fev 2015*	16:00 – 18:00h	Coleta de 02 <i>A. ceculus</i>			
A3N	25 Mar 2015	16:00 – 18:00h	Obs.: 01 <i>B. morio</i> ; 01 <i>A. ceculos</i>			
A3N	07 Maio 2015*	9:00 – 11:00h	Coleta de 07 <i>B. morio</i> ; Obs.: 01 <i>A. ceculos</i> ; 10 mamangavas	Temp.: 21,1 °C Vento: 50 km/h (S) RH: 56%		
A4N	17 Jan 2017*	6:00 – 10:00h	Avaliação do néctar instantâneo 3 vezes a cada hora. Coleta 02 <i>Xylocopa brasilianorum</i> Obs.: <i>A. ceculus</i>	Temp.: 30,0 °C Vento: 30 km/h (NE) UR: 80%		
Total de período de observação		28 horas				

* coleta de insetos

APÊNDICE B - Dossiê da mariposa beija-flor *Aellopos ceculus*

1) Savela (S.I) - Lepidoptera and some other life forms.

Aellopos Hübner, [1819]

- *Aellopos* Hübner, [1819]; *Verz. bek. Schmett.* (9): 131; TS: *Sphinx titan*
- *Aellopus[sic]*; Druce, 1881, *Biol. centr.-amer., Lep. Heterocera* 1: 1
- *Aellopos (Macroglossinae)*; [MABL]
- *Aellopos ceculus* (Cramer, [1777]) S. Mexico, Venezuela, Ecuador. See [maps]
- *Sphinx ceculus* Cramer, [1777]; *Uitl. Kapellen* 2 (9-16): 80, pl. 146, f. G; TL: Surinam
- *Macroglossum fasciatum* Swainson, 1822; *Zool. Illustr.* (1) 3: pl. 132
 - = ; Godman & Salvin, 1881, *Biol. centr.-amer., Lep. Heterocera* 1: 2
- *gehleni* (Closs, 1922)
- = ; [HMW] *Eupyrrhoglossum ceculus*; Godman & Salvin, 1881, *Biol. centr.-amer., Lep. Heterocera* 1: 2
- *Aellopos ceculus*; [HMW]; [MABL]

2) Cramer (1777) - Uitlandsche Kapellen (Papillons exotiques)



Fig. G. Ceculus. Deze Onruft-Pylftaart gelykt veel naar den *Sphinx Belis* †, maar de geele dwarsband over de ondervleugels, onderscheid dezen van den e-
 vengemelden. Van onder is de Borst met een gedeelte der vleugelen aan de gewrigten wit van kleur; het agterlyf donkerbruin, en wederzyds met vier

Fig. G. Ceculus. Ce *Sphinx* res-
 semble beaucoup au *Sphinx Belis* †,
 mais la bande transversale des ailes in-
 férieures constitue la différence entre eux.
 En-dessous la poitrine avec une partie
 des ailes, vers les jointures, est de cou-
 leur blanche; l'abdomen d'un brun ob-
 scur, & orné sur les deux surfaces de

UITLANDSCHE KAPELLEN.

PAPILLONS EXOTIQUES. 81

witte stippen gecierd; het overige gedeelte der vleugelen is bruin. Men vind ze in Surinamen.

quatre points blancs; le reste des ailes est brun. On le trouve à Suriname.

† Zie Pl. XCIV. Fig. C.

† Voyez la Planche XCIV. Fig. C.

3) Walker (1856) - List of the specimens of lepidopterous insects in the collection of the British Museum. Part VIII - Sphingidae.

South America.

South America has two types of *Macroglossa*, the one—or *M. Tantalus* and *M. Fadus*—like the European species in structure, the other comprising *M. Ceculus* and *M. Sagra*, and distinguished by the broader wings, and by the dilated abdomen.

5. MACROGLOSSA CECULUS.

Cinerea-fusca, subtus albida; abdomen vittis duabus anticis abbreviatis lateralibus luteis, maculis lateralibus posticis et inferioribus albis; alæ basi subtus albidae, anticæ fasciis undatis obliquis ferrugineo-fuscis; posticæ nigro-fuscae fascia lutea.

Sphinx Ceculus, *Cram. Pap. Exot.* ii. 80, pl. 146, f. G.

Psithyros Ceculus, *Hübner. Verz. Schmett.* 132, 1411.

Macroglossum fasciatum, *Swains. Illustr.* iii. pl. 132, f. 2.

a. Parà. Presented by J. P. G. Smith, Esq.

b. Brazil. Presented by E. Doubleday, Esq.

c. Mexico. From Mr. Argent's collection.

d—g. Brazil. From Mr. Mornay's collection.

h. Brazil. Presented by E. Doubleday, Esq.

4) BRECKENRIDGE (1859). Synopsis of North American Sphingidae. Journal of the academy of natural sciences of Philadelphia. VOL. IV.

7. *M. CECULUS*.—*Sphinx Ceculus Cramer* II. 80, pl. 146, f. G. *Psithyros Ceculus Hübner. Verz. Schmett.* 132, 1411. *Macroglossum fasciatum Swainson*, III. pl. 132, f. 2. *Macroglossa Ceculus Walker*, p. 89.

Head, palpi and thorax obscure brown; palpi beneath and breast white. Thorax with a blackish patch above the base of the wings. Abdomen brown inclining to blackish posteriorly, with two orange-colored spots on each side of the second and third segments, a blackish brown patch on the fourth and a pale yellow spot on the fifth, with a lateral tuft beneath it of the same hue. Terminal tufts dark brown. Abdomen beneath brown. Anterior wings obscure purplish brown, varied with dark brown; a dark brown patch at the base, with a line and band of the same hue crossing the disc; a dark brown demi-line extending from the origin of the medio-central nervule to the inner margin, and a line crossing the base of the nervules furcate above, with a subterminal band also furcate toward costa, of the same hue; a white spot in medio-central interspace. Posterior wings blackish-brown, with a central pale orange yellow band.

Collection of the Acad. Nat. Sciences, Philadelphia.

Geographical distribution.—S. America, Mexico.

5) DRUCE, Herbert (1881-1900) - Insecta. Lepidoptera-
Heterocera. Volume I.

Class INSECTA.

Order LEPIDOPTERA.

Suborder HETEROCERA.

Fam. SPHINGIDÆ*.

Subfam. MACROGLOSSINÆ.

AELLOPUS.

Aellopus, Hübner, Verz. bek. Schmett. p. 131 (1816).

Six species have been included in this genus, whereof four belong to South America and two to West Africa. It is doubtful, however, if the African forms are really congeneric, their narrow elongated bodies being very different from what is found in the American representatives of the genus. Of these latter two, or at most three, of the species are really distinct, the others being of doubtful value.

2. *Eupyrhroglossum ceculus*.

Sphinx ceculus, Cr. Pap. Ex. ii. p. 80, t. 146. f. G¹.

Macroglossa ceculus, Walk. Cat. viii. p. 88²; Boisd. Sp. Gén. des Lép. Hét. i. p. 359³.

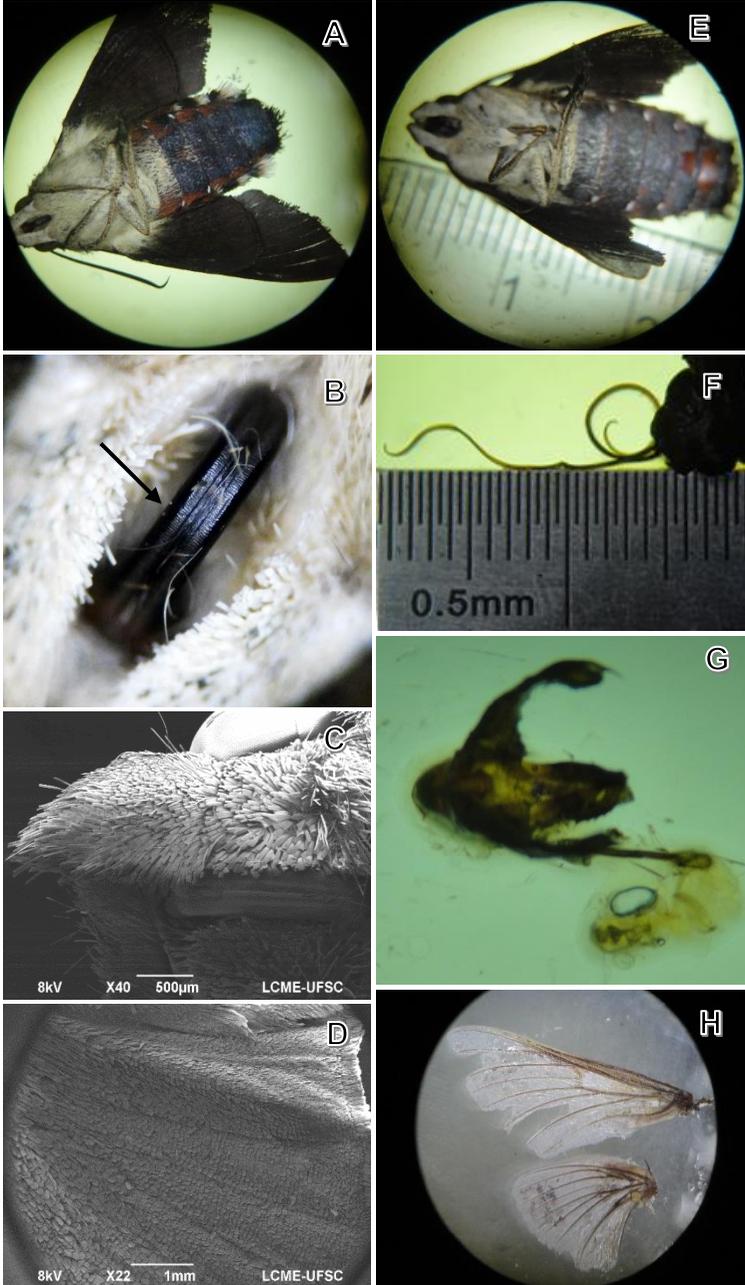
Macroglossum fasciatum, Sw. Zool. III. iii. t. 132. f. 2⁴.

Macroglossa corvus, Boisd. Lép. Guat. p. 66⁵?

Hab. MEXICO²; GUATEMALA, El Jicaró and Cubilguitz (*Champion*); NICARAGUA⁵; PANAMA, Chiriqui (*Arcé, mus. D.*).—COLOMBIA³; ECUADOR (*mus. D.*); TRINIDAD (*mus. D.*); GUIANA, Surinam¹, Cayenne³; AMAZONS, Para²; BRAZIL^{2 3 4}.

A species closely allied to the last, but easily recognized by the greater width of the yellow fascia on the secondaries and the absence of the yellow margin. *M. corvus* is a name proposed by Boisduval for a specimen said to have come from Nicaragua⁵. I believe it belongs to this species, but am not certain on the point.

Figura Apêndice B. *Aellopos ceculus* (Sphingidae) os mesmos espécimes mostrados na Figura 6, coletados visitando *Gaylussacia brasiliensis* em Restinga de Florianópolis. (A a D) Mariposa feminina e (E a H) exemplar masculino. (A, E) Vista ventral mostrando dimorfismo sexual (B) com poucos grãos de pólen na probóscide (seta preta), (C) cabeça sem pólen, e (D) asa adaptada para pairar em voo; (F) detalha o tamanho do probóscide, (G) genitália masculina e (H) nervuras das asas. (Próxima página)



REFERÊNCIAS - APÊNDICE B

BRECKENRIDGE, C., 1859. Synopsis of North American Sphingidae. Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. Vol. IV. Second Series. ART. V Part II 97-190. Disponível em : <<https://www.biodiversitylibrary.org/item/113513#page/13/mode/1up>> Acesso em 30 Out. 2017

CRAMER, P., 1777. Uitlandsche Kapellen (Papillons exotiques) Uitl. Kapellen 2 (9-16): 1-152, pl. 97-192 (1777). Disponível em: <<http://ia802307.us.archive.org/23/items/deuitlandschekap02cram/deuitlandschekap02cram.pdf>> Acesso 17, Set. 2017].

DRUCE, H., 1881-1900. Insecta. Lepidoptera-Heterocera. Volume I. [London: published for the editors by R.H. Porter]. Disponível em: <http://www.sil.si.edu/digitalcollections/bca/navigation/bca_15_01_00/bca_15_01_00.cfm?start=37> e
http://www.sil.si.edu/DigitalCollections/bca/navigation/bca_15_01_00/bca_15_01_00.cfm?start=38 [Accessed September 17, 2017].

SAVELA M., [?]. Lepidoptera and some other life forms. Disponível em: <http://ftp.funet.fi/index/Tree_of_life/insecta/lepidoptera/ditrysia/bombycycoidea/sphingidae/macroglossinae/aellopos/> Acesso em 17 Set. 2017, 2017].

WALKER F., 1856. List of the specimens of lepidopterous insects in the collection of the British Museum. Part VIII. – Sphingidae. Disponível em: <<https://www.biodiversitylibrary.org/item/120096#page/9/mode/1up>> Acesso em: 17 Out. 2017.

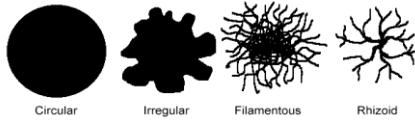
APÊNDICE C - Características macroscópicas das colônias para transformação de variáveis nominais em numéricas

forma	Abr.	Num.	textura	Abr.	Num.	Bordas	Abr.	Num.
circular	C	1	algodonosas	al	0	Regular	re	0
filamentoso	F	2	aveludas	av	1	Filiforme	fil	1
rizoide	R	3	cremosas	cr	2	ondulada	on	2
irregular	I	4	membranosas	me	3	Radiada	ra	3
			furfuráceas	fu	4	lobada	lo	4
			granulosas	gr	5	irregular	ir	5
			pulverulenta	pu	6			

superfície	Abr.	N	Topografia	Abr.	Num.	Aspecto	Abr.	Num.
lisa	li	0	plana	pl	0	opaco	op	0
camadas	ca	1	elevada	el	1	brilhante	br	1
fissurada	fis	2	pregueada	pr	2	úmido	um	2
rugosa	ru	3	convexa	co	3	Pigmentação no meio		
			umbilicada	um	4	ausente	A	0
			apiculada	ap	5	presente	P	1

cor da colônia	Num.
branco;	0
bege	1
creme;	
salmão	2
amarelo;	
laranja;	
salmão	3
rosa, lilás	4
verde,	
esverdeado;	
oliva	5
castanho;	
marrom	6
cinza; preto	7

Form



Elevation



Margin



AGAR MEDIA

1. PLATES (Colonies)

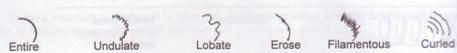
a) General surface form



b) Elevation



c) Margin



d) Surface Texture

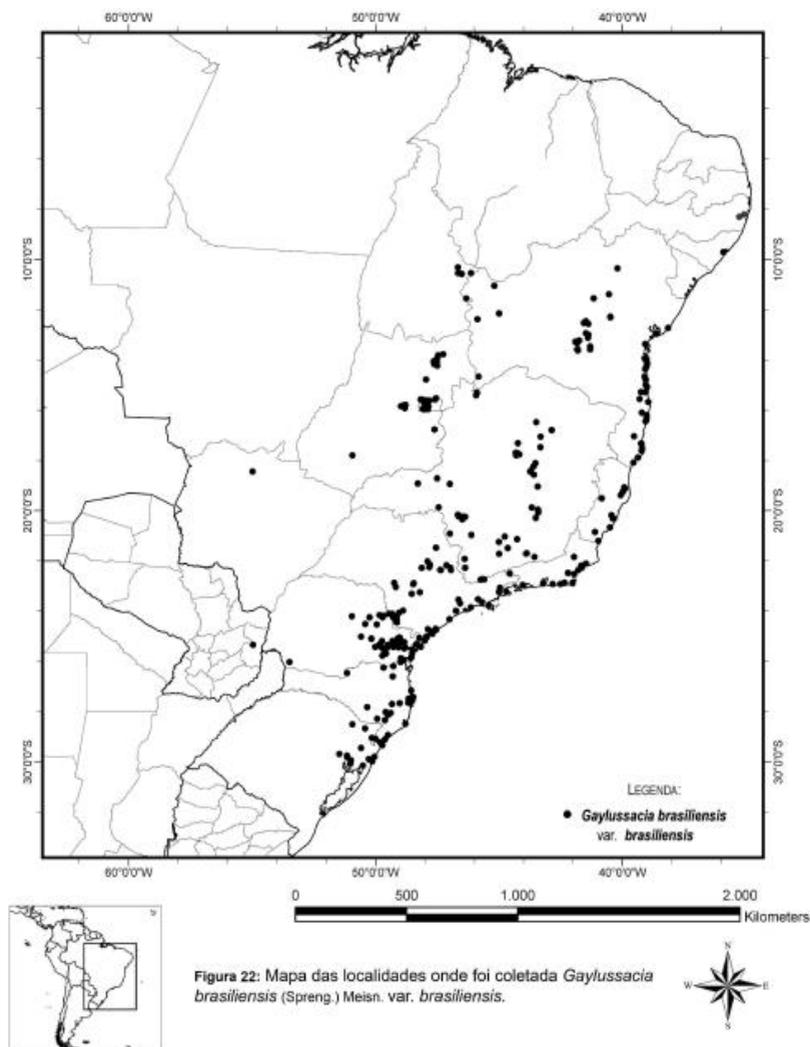


APÊNDICE D - Sequências dos isolados analisados – ITS1/ITS4

ID	Sequência ITS1/ITS4
Gb47	GTGTGGTCGCGGGCTCCGGGGGCTTTGCCCTGGGTGGTAGAGGTAACACTCTCACGCGC CACATGTCTGAATCCCTTTTTTACGAGCACCTTTCGTTCTCCTTCGGCGGGGCAACCTGC CGTTGAACTTATCAAAACCTTTTTT-GCATCTAGCATTACCTGTTTCAGATACAAACAAT CGTTACAACCTTCAACAATGGATCTCTTGCTCTGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAAT GCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCG GCCCTTTGGTATTCATGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTACATACACCCTCAAGCTTCG TTGGTGTGGGGCTGTGCCGCTCCGGCGTGGACTCGCCCAAATTCATTGGGACGG GTCTTTGCCCTCTCGCGCAGCACATTGCGCTTCCGAGGGCGTGGGGCCGCTCCACGA AGCAACATTACCGTCTTTGACCTCGGATCAGGTACCGGATACCCGCTGAACCTAA
Gb209'	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAATAAACATATGAAGGCTGCACCGCCA ACAGGCGGCAAGGCTGGAGTATTTTATTACCCTTGCTCTTTTGGCAGCTTGTGTTTTCCTG GGCCGTTGCGCCCGCTCCAGGACCACATGATAACCTTTTTCGCGACTTGTGTTTCAGC GTGATGACAACAATGTAATCATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCA TCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCGAAGGGCATGCTGTTTCGAGCGT CATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCTTTTGTCTTTGGTTTTGTCCAA GACTCGCCTTAAACGATTGGCAGCGCGCCTACTGGTTTCGACGCGCAGCACATTTTTCG GCTTGAACATCAGCAAAAGGACGGCACTCCATCAAGACTCTATATCACTTTGACCTCGG ATCAGG
Gb209' r	GAACCTGCGGAGGGATCATTACACAATAACATATGAAGGCTGTACGCGGCTGCGCCCTCG GGCCAGTTG-GCTGAGGCTGGAGTATTTTACCCTTGCTCTTTTGGCAGCTTGTGTTTCCTG CTGGGCGGGTTCGCCGCCACCAGGACCACATGATAAACCTTTTTTATGCAAGTTCGAAT CAGCGTCAGTACAACAATGTAATCATTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCT GGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGA TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCGAAGGGCATGCTGTTTCGA GCGTCAATTTGACCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCTTTTGTCTTTGGTCAACAA AGACTCGCCTTAAACGATTGGCAGCGCGCCTACTGGTTTCGAGCGCAGCACATTTTTCG CGCTTGAATCAGCAAAAGGACGGCACTCCATCAAGACTCTTCTTACGTTTGCCTC GGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA
Gb09M	CGCCCGCGAAGACACCATTGAACTCTTGCTGAAGATTGCAGTCTGAGTGATTAGCTAA ATCAGTTAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCAGCGGA AATGCGATAAGTAATGTAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT TGCCGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTATTGCTGCCCTCAAGCAC GGCTTGTGTGTTGGGCCCGCCCGGTTCCGGGGGGGGGGCCGAAAGGCAGCGGCG GCACCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCGCG CGCCCGCGGCGA
Gb09r1	CGCCCGCGAAGACACCATTGAACTCTTGCTGAAGATTGCAGTCTGAGTGATTAGCTAA ATCAGTTAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCAGCGGA AATGCGATAAGTAATGTAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT TGCCGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTATTGCTGCCCTCAAGCAC GGCTTGTGTGTTGGGGCCCGCCCGGTTCCGGGGGGGGGGCCGAAAGGCAGCGGCG GCACCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCGCG CGCCCGCGGCGA
Gb09r6	GGCCCGCGAAGACACCATTGAACTCTTGCTGAAGATTGCAGTCTGAGTGATTAGCTAA ATCAGTTAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCAGCGG AATGCGATAAGTAATGTAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACA TTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTATTGCTGCCCTCAAGCA CGGCTTGTGTGTTGGGCCCGCCCGGTTCCGGGGGGGGGGCCGAAAGGCAGCGGCG GGCACCCTGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCGCG GCGCCCGCGGCGACCCCATCAATCTCCAGG
Gb225	AGGCCGACTCCCAACCTTTGTTTACCGAACCTCTGTGCTTCGGCGGGCCGCTCTCA CGACCGCGGAGGACCGCCGACAGGTGCTCCTTGGCCCGTGTCCGCCGATAGCCAACCT CTCCAACCTCTGATGAATCGTGTCTTTATTCTAAGTCTATGATTTAAACAATTCaAA AAGCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAAT GCGATAAGTAATGCGAATTCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG CGCCCTTTGgTATTCCAAgGGCATGCCTGTTCGAGCCCTTATCACCTTCAAGCCCT CTGGCTTGGTGTGGACCGCTTGGTTGACCGCAAGCTCGACCCCTCAAGACAATGAC GGCGCCCGCGGACCCCGGTACTGAGCTTTTTCATCGAGCATGTGTCGGACAAGGGT

	CCCCGGGACACGG
Gb104 M	GTGACATACCACCTTGTTCGCTCGGCGGATCAGCCCCGCTCCCGGTA AAAACGGGACGGCCCGCCG CCAGAGGACCCCTAAAACCTGTGTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAAATAAAATC AAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGCA TAAGTAATGTGAATTCGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCG GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTGGT TGTTGGGACTCGCGTTAAATTCGCGTTCCTCAAAATGATTGGCGGTACGCTCGAGCTTCCA TAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAA CTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA CGGA
Gb104r	ACATACCACCTTGTTCGCTCGGCGGATCAGCCCCGCTCCCGGTA AAAACGGGACGGCCCGCCCA GAGGACCCCTAAAACCTGTGTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAAATAAAATCAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAA GTAATGTGAATTCGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTGGTGG TGGACTCGCGTTAAATTCGCGTTCCTCAAAATGATTGGCGGTACGCTCGAGCTTCCATAG CGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCG
Gb231	ACTTATACCTTTGTTCGCTCGGCGCATGCTGGTCTCTAGTAGGCCCTCACCCCGGTGA GGAGACGGCAGCCGGCGGCAAGTAACTCTGTTTTTACACTGAACTCTGAGAAAAA ACACAAATAAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACG CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTCGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC GCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGGAGGACATGCCTGTTCCAGCGACATTTCAACCCCTC AAGCACTGCTTGGTGTGGGGCACTGCTTTTACGAAAGAGGCCCTGAAATCTAGTGGCG AGCTCGCCAGGACCCCGAGCGCAGTAGTTAAACCCCTCGCTTTGGAAGGCCCTGGCGGTGC CCTGCGGTTAAACCCCAACTTCTGAAAATT
Gb207	GTGGCCGCCCGGGGCTGCGAGCCCCCGGCCCCCTCGCGGGGGCGCCCGCCGGAGGATA CCCAACTCTTGATTATTTTAGGCCTCTCTGAGTCTCTGACTGAAATAAGTCAAACTTT CAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT GTGAATTCGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTAT TCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCGAGCTTGTGTTGGG GACCTGCGGCTGCGCAGGCCCTGAAATCCAGTGGCGGGTTCGCTGTACCCCGAGCGTA GTAGCAATATCTCGCTCAGGGCGTGTGCGGGCACCGGCCCTGAAAAGCTGCCTTCTGGC AACACCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAGACCCCGTGAACCTTAAGCATATCAA
Gb260	CCGCGGGCGCCCGCCGGAGGTCACCAAACCTCTTGATAATTTATGGCCTCTCTGAGTCTTC TGACTGAAATAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAA CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTCGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA ACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTTGCGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAACCA TCAAGCCCGCGGGCTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGAGGCCCTGAAAAGCAGTGGC GGCTCGCTGTGCAACCGAGCGTAGTAGCATACATCTCGCTCTGGTTCGCGCCGCGGGTTC CGGCCGTTAAACCACTTTTAAACCAAGGT-GACCTCGGATCAGTA
Gb261	AACCATTTGGGACGCTACCTTTTAAACGTTGCTTCGGCGGGCGGCCCGCTCCCTGGAAG CCCTGTGGCCCGCCGGGCTGCGAGCCCCCGGCCCTCGCGGGGGCGCCCGCCGGA GGATACCCAACTCTTGATTATTTTAGGCCTCTCTGAGTCTTCTGTACTGAATAAGTCAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTCGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCGAGGCTGTG TTGGGACCTGCGGCTGCGCAGCCCTGAAATCCAGTGGCGGGTTCGCTGTACCCCGCA CGTAGTAGCAATATCTCGCTCAGGGCGTGTGCGGGCACCGGCCGTTAAAAGCTGCCTT CTGGCAACACCAAGGT

ANEXO A – Mapa de distribuição de coletadas de *Gaylussacia brasiliensis*



Distribuição de coletadas de *Gaylussacia brasiliensis* Meisn. var. *brasiliensis*. Fonte: Romão (2011)

ANEXO B - Registro em herbários¹ de coletas de *Gaylussacia brasiliensis* em Santa Catarina

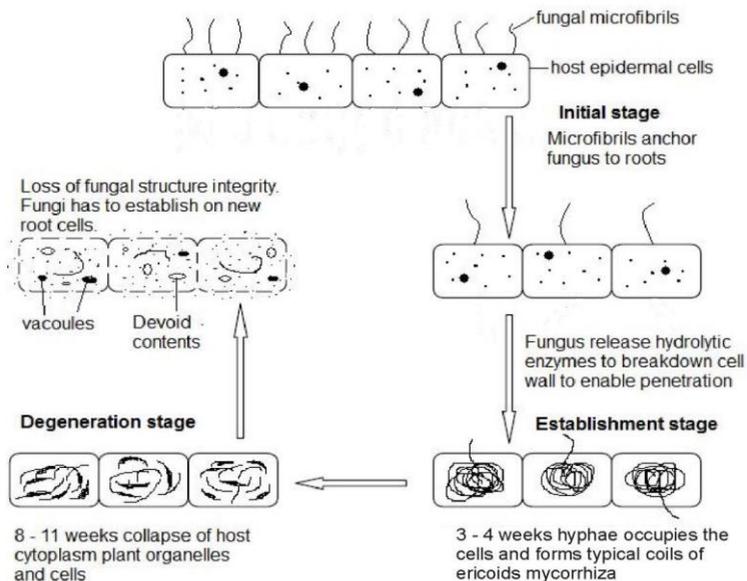
Dist. Geo	Município	Localização	Vegetação	Fonte
Litoral Central	Florianópolis	Canasvieiras; Lagoa da Conceição, Rio Tavares; Joaquina; Jurerê; Jurerê internacional; Rio Vermelho	FOD - Restinga	splink
	Palhoça	Morro do Cambirela; Rio Massiambu	FOD -	splink
	Palhoça	Praia do Sonho	FOD - Restinga	(Bramorski, 2011)
	Biguaçu	Serra do Faxinal	FOD	splink
Planalto	Rancho Queimado	Alto da Boa Vista; Morro Chato?	FOM - campo de altitude	splink
	Alfredo Wagner	Morro do Trombudo	FOM	splink
	São Joaquim	Fazenda morrinhos; Serra do Oratório (margem do rio Capivaras); Nova serra		splink
	Bom Jardim da Serra	Serra do Rio do Rastro; Serra do Oratório	FOM	splink
	?Bom Retiro ou Urubici	Campo dos Padres	FOM- campo de altitude	splink
	Urubici	Campo dos Padres; estrada entre Urubici e Grão Pará; Morro da Cruz; Morro da Igreja; Salto Avencal		splink
	Lages	?		splink
	Monte Castelo	Serra da Garganta		splink
	Campo Alegre	Serra Quiriri; Rio dos Alemães	FOM	splink
	Mafra	15km Rio Negrinho		splink
	Matos Costa			splink
	Major Vieira	Rio da Serra		splink
	Norte	Porto Belo	Zimbros	FOD - Restinga
Blumenau		topo de morro?	FOD - montana	Her.Flora de SC ²
Apiúna		Morro da Palha		splink
Garuva?		Monte Crista; Morro do Campo Alegre	FOM	splink
Itapoá		Praia da Paquera	FOD - Restinga	splink
Corupá				
Sul	Garopaba	Praia do Ouidor	FOD - Restinga	(Hentschel, 2008) ³
	Laguna	Praia do Sol	FOD - Restinga	splink
	Içara	Balneário Rincão	FOD - Restinga	splink
	Passos de Torres	Morro dos Conventos		splink

¹ <http://inct.splink.org.br/>

² <https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/plantae/magnoliophyta/caixa-de-deposito/gaylussacia-brasiliensis>

³ HENTSCHEL, R. L. (2008). Gradiente vegetacional, variáveis ambientais e restauração na Restinga da praia do ouvidor, Garopaba, Santa Catarina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ANEXO C - Série de eventos que ocorrem durante a formação da associação de micorrizas ericóides nas raízes dos cabelos de Ericaceae. Os estágios incluem iniciação, estabelecimento e degeneração, com duração de até 11 semanas.



Fonte: Bizabani (2015)