

Mary Luz Vanegas León

**ECTOMICORRIZAS TROPICAIS: ESTUDOS DE CASO NA  
MATA ATLÂNTICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Alice Neves. Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Aida Vasco

Florianópolis

2017

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

Vanegas-León, Mary Luz  
ECTOMICORRIZAS TROPICAIS: ESTUDOS DE CASO NA  
MATA ATLÂNTICA / Mary Luz Vanegas-León ;  
orientadora, Maria Alice Neves ; coorientadora,  
Aida Marcela Vasco. - Florianópolis, SC, 2017.  
78 p.

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

Inclui referências.

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

## **Agradecimientos**

A mi familia que a pesar de la distancia ha estado a mi lado apoyándome, dándome amor y ánimo en los momentos más difíciles. Son mi alegría y razón de vida. Los extrañé siempre.

A Jaime por su amor y compañía infinita, por tantos momentos de risas y locuras.

A Maria Alice por la amistad que construimos en este tiempo de trabajo intenso y gratificante. Gracias por confiar tanto en mí.

Al MICOLAB donde pase momentos muy bonitos e hice nuevos amigos. Me despido feliz de haber conocido personas tan maravillosas y llenas de amor, gracias por la comprensión y por compartir un poco de la linda cultura Brasileira.

Gracias especiales a Lina por acompañarme mes a mes a coleccionar, por ayudarme en la actividad más difícil de este trabajo que fue triar el suelo y observar miles de raíces en la lupa. Gracias por tanto

Al PPGFAP por la oportunidad única

A la turma PPGFAP 2015 por tanta amistad y compañerismo.

A CAPES vía PPGFAP-UFSC por la beca que permitió que este trabajo fuera realizado.

A todos los que participaron en el desarrollo de este trabajo

¡Muchas gracias!

## Resumo

As micorrizas são as relações simbióticas mutualísticas entre os fungos e as raízes das plantas. Os principais tipos de micorrizas são as arbusculares (MA) e as ectomicorrizas (EcM). Os fungos ectomicorrízicos são essenciais para o desenvolvimento de aproximadamente 10% das famílias de plantas. As EcM têm sido muito estudadas em ambientes temperados e boreais mas recentemente as pesquisas nos trópicos começaram a ser feitas. A Mata Atlântica é um ecossistema altamente diverso e estudos que incluem a análise de raízes micorrizadas são escassos. O objetivo deste trabalho foi contribuir para ampliar o conhecimento das associações ectomicorrízicas da mata nativa do sul do Brasil. Basidiomas e raízes foram coletados e analisados molecularmente por meio do sequenciamento da região ITS e *rbcL*. Foram obtidas 29 sequências de raízes (23 ITS e 6 *rbcL*), sete de Ascomycota e 16 de Basidiomycota, e 40 sequências de espécimes (basidiomas). O grupo mais representativo foi Russulaceae, uma família tipicamente ectomicorrízica, que foi encontrada associando-se a Nyctaginaceae e Moraceae. Para *Trechispora*, um gênero que ainda não foi descrito como ectomicorrízico, foram encontradas evidências moleculares e morfológicas de algumas espécies do gênero como formadoras de ectomicorrizas. Alguns gêneros só foram encontrados nos basidiomas ou só nas raízes. Portanto é muito importante continuar as pesquisas na Mata Atlântica onde possivelmente existem fungos e plantas ectomicorrízicas ainda não descritos.

**Palavras chave:** Fungos ectomicorrízicos, Ilha de Santa Catarina, Floresta Ombrófila Densa, Restinga, Russulaceae, *Trechispora*.

## **Abstract**

Mycorrhizae is a symbiotic relationship between fungi and the plant roots. The main types of mycorrhizae are the arbuscular mycorrhizae (AM) and the ectomycorrhizae (EcM). Ectomycorrhizal fungi play an important role in the development of 10% of plant families worldwide. The EcM have been well documented in temperate regions for several decades and only recently have started to be studied in tropical regions. The Mata Atlantica is a highly diverse ecosystem where the EcM are poorly studied. The main objective of this study was to contribute to increase the knowledge about the EcM associations in native forest ecosystems in Southern Brazil. Basidiomes and roots were collected and were molecularly analyzed through sequences of the ITS region. Twenty three EcM sequences were obtained from the roots, seven from Ascomycota and 16 from Basidiomycota. Forty-six sequences were obtained from basidiomes. The best represented group was Russulaceae, a well documented family as EcM forming fungi. Russulaceae was found in association with Nyctaginaceae and Moreaceae. *Trechispora* is a genus in the Hydnodontaceae family not previously documented as EcM forming fungi, but in the present study molecular and morphological evidences show that some species from *Trechispora* form EcM associations were found. Some genera were found only above soil (basidiomes) and others were only found in the roots. Therefore, it is very important to continue the research in the Atlantic Forest where there are possibly ectomycorrhizal fungi and plants not yet described.

**Key words:** Ectomycorrhizal Fungi, Santa Catarina island, Mata ombrofila densa, Restinga, Russulaceae, *Trechispora*.

## Sumário

Resumo.....	4
Abstract.....	5
Introdução.....	7
Objetivos.....	11
Materiais e Métodos: Informações gerais.....	11
Resultados.....	13
Referências.....	23
Capítulo 1: Russulaceae: evidências morfológicas e moleculares de ectomycorrizas na Mata Atlântica.....	26
Capítulo 2: <i>Trechispora</i> : a genus with ectomycorrhizal species	48
Considerações finais.....	67
Apêndice I.....	73
Apêndice II.....	75
Apêndice III.....	77
Apêndice IV.....	77
Apêndice V.....	78

## Introdução

O reino dos Fungos está composto por organismos eucariotas, heterotrofos e quimiororganotrofos. A nutrição ocorre pela absorção de nutrientes, onde exoenzimas são liberadas no substrato realizando uma digestão extracelular. A maioria dos fungos são aeróbios estritos, porém determinados grupos são aeróbios facultativos e um grupo menor é anaeróbio estrito (Cepero *et al.*, 2012). Os organismos que pertencem ao reino Fungi estão distribuídos em todo o planeta e colonizam os mais diversos ambientes: solo, ar, água doce e água salgada e alguns fungos habitam o interior de animais ou plantas (Blackwell, 2011).

Os fungos são componentes essenciais dos ecossistemas, participam do ciclo do carbono, e do nitrogênio, ajudam na decomposição da matéria orgânica e na mineralização das rochas (O'Brien *et al.*, 2005; Cepero *et al.*, 2012). As estimativas da riqueza de espécies dentro do reino vão de 1,5 até 5,1 milhões de espécies, porém, só cem mil espécies foram descritas até agora (Hawksworth, 1991; O'Brien *et al.*, 2005). Portanto, muitas espécies de fungos permanecem sem ser descritas. Acredita-se que muitas espécies habitam lugares pouco explorados ou participam de interações com outros organismos, como é o caso dos líquens, os fungos endófitos ou as micorrizas (Blackwell, 2011).

O termo "micorriza" (do Grego *mykes*: fungo e *rhiza*: raiz) foi utilizado pela primeira vez por A. B. Frank em 1885. Micorriza é a associação simbiótica mutualista entre determinados fungos e as raízes das plantas (Kirk *et al.*, 2008; Moyersoen, 2012). Nesta associação, o fungo leva água e nutrientes à planta. O fungo é muito importante na

captação de nitrogênio, fósforo e carbono dissolvidos no solo (Heijden *et al.*, 2015). As hifas agem como uma extensão das raízes incrementando a superfície de absorção, profundidade e distância para disponibilizar uma maior quantidade de água (Halling, 2001; Smith & Read, 2008). Os fungos micorrízicos também possuem a capacidade de proteger a planta de doenças nas raízes (Smith *et al.*, 2013). Em troca, o fungo recebe carboidratos produzidos na fotossíntese da planta (Smith & Read, 2008; Brearley, 2012).

Associações micorrízicas são muito antigas. O fóssil mais antigo de micorriza tem aproximadamente 410 milhões de anos e acredita-se que a colonização das plantas nos ecossistemas terrestres tenha sido possível pela simbiose fúngica (Blackwell, 2000; Halling 2001; Heijden *et al.*, 2015).

Diversas linhagens de fungos adquiriram independentemente a capacidade de se associar com as plantas, utilizando diferentes estratégias. Estima-se que 80% de todas as plantas estão associadas com fungos do filo Glomeromycota (Blackwell, 2011). Glomeromycota compreende aproximadamente 250 espécies e todas fazem associações simbióticas, a grande maioria micorrízicas. As espécies do filo caracterizam-se por ter micélio cenocítico e pela formação de esporos assexuados, sendo a reprodução sexual desconhecida (Bonfante & Genre, 2010). As micorrizas do filo Glomeromycota são chamadas endomicorrizas ou micorrizas arbusculares (MA). O micélio das MA tem capacidade de penetrar as paredes celulares das raízes e formar arbúsculos e vesículas (Schüßler *et al.*, 2001; Courty *et al.* 2010). Algumas micorrizas distinguem-se pelo grupo de planta com a qual é



feita a associação, por exemplo, as micorrizas ericoides e as orquidoides estão associadas só com as famílias Ericaceae e Orquideaceae, respectivamente (Smith e Read, 1996; Heijden *et al.* 2015).

As ectomicorrizas (EcM) caracterizam-se pela formação do manto e rede de Hartig. A rede de Hartig é composta por hifas que ocupam os espaços intercelulares do córtex da raiz, e o manto é a camada de hifas que cobre externamente a superfície radicular. Este tipo de micorriza não penetra as paredes celulares da planta (Halling, 2001; Smith & Read, 2008; Bonfante & Genre, 2010; Tedersoo *et al.*, 2010a; Cepero *et al.*, 2012; Heijden *et al.*, 2015). O fóssil mais antigo tem 50 milhões de anos, mas acredita-se que a origem deste tipo de simbiose pode ter sido há 180 milhões de anos (Taylor e Alexander, 2005).

Os fungos ectomicorrízicos têm a capacidade de associar-se com várias plantas através de um mesmo micélio. Esta conectividade entre a planta e o fungo permite o intercâmbio de água e nutrientes, como fósforo, nitrogênio, potássio e micronutrientes até as plantas. A conexão entre as plantas é extremamente importante para o estabelecimento de plântulas nas florestas as quais são auxiliadas por árvores adultas já estabelecidas (Simard e Durall, 2004; Courty *et al.* 2010; Heijden *et al.* 2015). As ectomicorrizas são muito importantes na formação e manutenção da estrutura do solo, aumentando a areação e reduzindo a erosão (Rillig & Mummey, 2006).

Ectomicorrizas evoluíram 66 vezes independentemente a partir de ancestrais saprófitos, e pertencem aos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota. (Tedersoo *et al.*, 2010a) (Apêndice I). Em sua grande maioria os fungos ectomicorrízicos pertencem ao filo Basidiomycota (Rinaldi *et al.*, 2008) Esta associação é altamente diversa e pode ter entre 7.000 e 10.000 espécies de fungos envolvidos (Taylor e Alexander, 2005).

No Brasil, os primeiros estudos de fungos EcM foram realizados para a região amazônica, nas florestas de campina, campinarana e “igapó” (florestas inundáveis amazônicas) e foram descritas 38 novas espécies em 19 gêneros (Singer *et al.* 1983). Yokomizo (1986) descreveu oito espécies novas de fungos EcM em plantações de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp. no estado de São Paulo. Giachini *et al.* (2000) encontrou 49 espécies em 12 famílias e 9 ordens em plantações de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp., a maioria novos registros para América do Sul, além de três espécies novas para a ciência. Atualmente no Brasil estão registradas 175 espécies de fungos Basidiomycota potencialmente EcM em áreas de floresta nativa (Roy *et al.*, 2016). Os gêneros mais representativos são *Russula* Pers., *Amanita* Pers., *Coltricia* Gray., *Phlebopus* (R. Heim) Singer. e *Cantharellus* Juss. Os fungos EcM já foram registrados em 23 dos 27 estados do Brasil, e são mais frequentes ao longo do litoral (Roy *et al.*, 2016).

## **Objetivo geral**

Ampliar o conhecimento sobre as linhagens ectomicorrízicas presentes na Mata Atlântica do sul do Brasil.

## **Objetivos Específicos**

- Identificar morfológica e molecularmente basidiomas que pertencem a linhagens ectomicorrízicas na Mata Atlântica do sul do Brasil.
- Identificar molecularmente fungos ectomicorrízicos presentes em raízes de plantas na Mata Atlântica do sul do Brasil..
- Registrar plantas potencialmente ectomicorrízicas na Mata Atlântica do sul do Brasil.

## **Materiais e Métodos: Informações gerais**

*Informação detalhada dos materiais e os métodos se encontra no capítulo 1*

### **Basidiomas**

Foram coletados 40 basidiomas (figura 1) que pertencem a gêneros potencialmente ectomicorrízicos. Os gêneros mais coletados foram *Russula* (oito coletas), *Lactifluus* (sete coletas) e *Entoloma* (seis coletas) (Tabela 1). Os basidiomas foram analisados segundo características morfológicas diagnósticas e molecularmente usando o marcador molecular ITS, seguindo protocolos de extração, amplificação e purificação (Apêndices II, III, IV).

## **Fungos das Raízes**

Cem amostras de solo e raízes foram analisadas, 48 morfotipos possuíam características típicas de fungos ectomicorrízicos (Tabela 2). As amostras foram desidratadas em sílica-gel e maceradas usando o Precellys 24 de Bioamérica® (6000rpm 20 segundos duas vezes com um intervalo de 15 segundos). A extração de DNA foi feita com o kit DNeasy plant mini kit de Quiagen®. A amplificação (DNA 1:10) e purificação foram feitas seguindo os protocolos descritos nos apêndices III e IV. Destes 48 morfotipos, só foram amplificados com sucesso 23; sete pertencentes ao filo Ascomycota e 16 ao filo Basidiomycota. *Lactifluus* foi o gênero mais frequente nas raízes, com 6 amostras, seguido de *Trechispora* com 3 amostras. (Figura 2).

## **Simbiontes**

O marcador molecular *rbcl* foi usado para amplificar as possíveis plantas ectomicorrízicas ao nível de família. A amplificação foi feita a partir do produto de extração das raízes seguindo o protocolo descrito no Apêndice V. Não houve uma concentração ótima de DNA para todas as amostras, em algumas foi usado o DNA total, em outras foi 1:10 e em outras usou-se uma concentração de 1:50. Para a maioria das amostras não foi possível identificar a família hospedeira. (Tabela 3).

## Resultados

Os resultados desta dissertação estão organizados em:

- ✓ Resultados gerais
- ✓ Capítulo 1 - intitulado **Russulaceae: evidências morfológicas e moleculares de ectomycorrizas na Mata Atlântica** A ser submetido para a revista *Mycorrhiza*. Neste capítulo é apresentada uma filogenia molecular de Russulaceae a partir do sequenciamento de 15 basidiomas dos gêneros *Russula*, *Lactarius* e *Lactifluus* e sete amostras de raízes micorrizadas coletadas na Mata Atlântica do sul do Brasil. São registados pela primeira vez os gêneros *Russula* e *Lactifluus* associados a raízes de plantas nativas. Para a reconstrução filogenética foi usado o marcador molecular ITS e feitas análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana.
- ✓ Capítulo 2 - intitulado ***Trechispora*: a genus with ectomycorrhizal species** A ser submetido para a revista *Mycorrhiza*. Neste capítulo é apresentada uma filogenia molecular de *Trechispora* a partir do sequenciamento de um basidioma e três raízes micorrizadas coletadas na Ilha de Santa Catarina, sul de Brasil. O gênero *Trechispora* é sugerido como linhagem ectomicorrízica nova. Para a reconstrução filogenética foi usado o marcador molecular ITS através de análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana.

## Resultados gerais

**Tabela 1:** Basidiomas potencialmente ectomicorrízicos estudados

Fungo	Coleta	Localidade	Data	FLOR	GenBank (ITS)	Linhagem ectomicorrízica
<i>Amanita</i> sp.	MVL 47	Trilha Lagoinha do leste	Jan 04-2016	61395	KY769843	/amanita
<i>Amanita</i> sp.	MVL 60	Unidade de Conservação Ambiental Desterro	Jan 08-2016	61396	KY769850	/amanita
<i>Amanita</i> sp.	MVL 65	Trilha Naufragados	Jan 09-2016	61397	KY769853	/amanita
<i>Amanita</i> sp.	MVL 80	Caraguatatuba (SP)	Jan 19-2016	61398	KY769858	/amanita
<i>Cantharellus</i> sp.	MVL 20	Trilha Naufragados	Jun 05-2015	61401	KY769833	/cantharellus
<i>Cantharellus</i> sp.	MVL 44	Trilha Lagoinha do leste	Jan 04-2016	61405	-	/cantharellus
<i>Cantharellus</i> sp.	MVL 66	Trilha Naufragados	Jan 09-2016	61403	-	/cantharellus

**Cont.**

<b>Fungo</b>	<b>Coleta</b>	<b>Localidade</b>	<b>Data</b>	<b>FLOR</b>	<b>GenBank (ITS)</b>	<b>Linhagem ectomicorrízica</b>
<i>Cantharellus</i> sp.	MVL 67	Trilha Naufragados	Jan 09-2016	61404	-	/cantharellus
<i>Cantharellus</i> sp.	MVL 69	Trilha Naufragados	Jan 09-2016	61402	-	/cantharellus
<i>Clavulina</i> sp.	MVL 74	Caraguatatuba (SP)	Jan 19-2016	61408	KY769857	/clavulina
<i>Clavulina</i> sp.	MVL 57	Trilha Lagoinha do leste	Jan 04-2016	61407	KY769848	/clavulina
<i>Clavulina</i> sp.	MVL 86	Caraguatatuba (SP)	Jan 20-2016	61409	-	/clavulina
<i>Entoloma</i> sp.	MVL 41	Lagoa de Peri	Jan 03-2016	61411	KY769838	/entoloma
<i>Entoloma</i> sp.	MVL 58	Trilha Lagoinha do leste	Jan 04-2016	61412	KY769849	/entoloma
<i>Entoloma</i> sp.	MVL 64	Unidade de Conservação Ambiental Desterro	Jan 08-2016	61413	KY769852	/entoloma
<i>Entoloma</i> sp.	MVL 82	Caraguatatuba (SP)	Jan 19-2016	61414	KY769859	/entoloma

**Cont.**

<b>Fungo</b>	<b>Coleta</b>	<b>Localidade</b>	<b>Data</b>	<b>FLOR</b>	<b>GenBank (ITS)</b>	<b>Linhagem ectomicorrízica</b>
<i>Entoloma</i> sp.	MVL 97	Morro do canal (PR)	Jan 22-2016	61415	KY769865	/entoloma
<i>Entoloma</i> sp.	MVL 99	Morro do canal (PR)	Jan 23-2016	61416	-	/entoloma
<i>Lactarius</i> sp.	MVL 52	Trilha Lagoinha do leste	Jan 04-2016	61422	KY769845	/russula-lactarius
<i>Lactarius</i> sp.	MVL 56	Trilha Lagoinha do leste	Jan 04-2016	61421	KY769847	/russula-lactarius
<i>Lactifluus</i> sp.	J. Duque 119	Morro da lagoa	Nov 10-2015	61428	KY769866	/russula-lactarius
<i>Lactifluus</i> sp.	J. Duque 120	Morro da lagoa	Nov 10-2016	61429	KY769867	/russula-lactarius
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL 31	Morro da lagoa	Dez 29-2015	61423	KY769836	/russula-lactarius
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL 43	Trilha Lagoinha do leste	Jan 04-2016	61424	KY769840	/russula-lactarius
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL 51	Trilha Lagoinha do leste	Jan 04-2016	61425	KY769844	/russula-lactarius

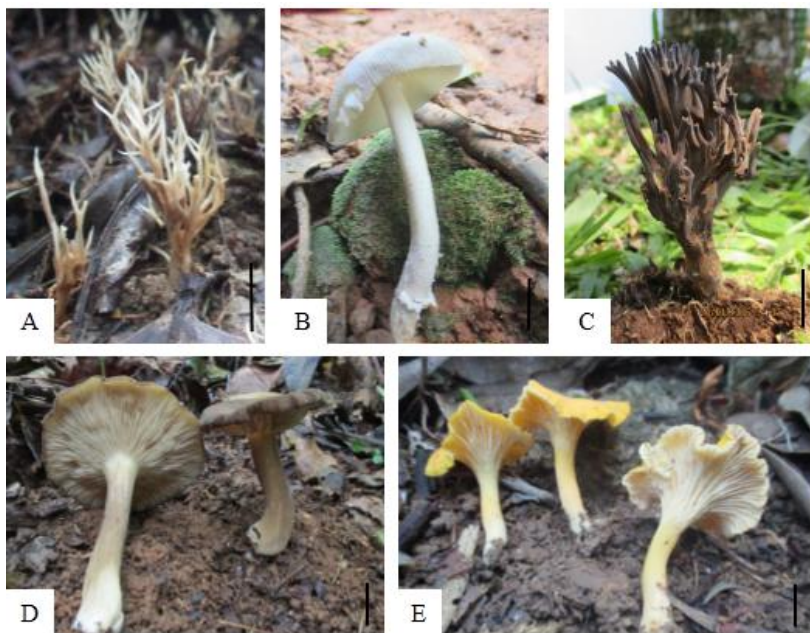


**Cont.**

<b>Fungo</b>	<b>Coleta</b>	<b>Localidade</b>	<b>Data</b>	<b>FLOR</b>	<b>GenBank (ITS)</b>	<b>Linhagem ectomicorrízica</b>
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL 63	Unidade de Conservação Ambiental Desterro	Jan 08-2016	61426	KY769851	/russula-lactarius
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL 71	Trilha Naufragados	Jan 09-2016	61427	KY769855	/russula-lactarius
<i>Ramaria</i> sp.	MVL 101	Morro do canal (PR)	Jan 23-2016	59327	-	/ramaria-gautieria
<i>Ramaria</i> sp.	MVL 59	Trilha Lagoinha do leste	Jan 04-2016	61434	-	/ramaria-gautieria
<i>Ramaria</i> sp.	MVL 62	Unidade de Conservação Ambiental Desterro	Jan 08-2016	61433	-	/ramaria-gautieria
<i>Russula puiggarii</i>	MVL 22	Dunas lagoa da Conceição	Out 06-2015	61435	KY769834	/russula-lactarius
<i>Russula puiggarii</i>	MVL 30	Morro da lagoa	Dez 29-2015	61436	KY769835	/russula-lactarius

**Cont.**

<b>Fungo</b>	<b>Coleta</b>	<b>Localidade</b>	<b>Data</b>	<b>FLOR</b>	<b>GenBank (ITS)</b>	<b>Linhagem ectomicorrízica</b>
<i>Russula puiggarii</i>	MVL 40	Lagoa de Peri	Jan 03-2016	61437	KY769837	/russula-lactarius
<i>Russula</i> sp.	MVL 45	Trilha Lagoinha do leste	Jan 04-2016	61439	KY769841	/russula-lactarius
<i>Russula</i> sp.	MVL 46	Trilha Lagoinha do leste	Jan 04-2016	61441	KY769842	/russula-lactarius
<i>Russula</i> sp.	MVL 68	Trilha Naufragados	Jan 09-2016	61438	KY769854	/russula-lactarius
<i>Russula</i> sp.	MVL 95	Caraguatatuba (SP)	Jan 21-2016	61440	KY769864	/russula-lactarius
<i>Russula violaceotunicata</i>	MVL 54	Trilha Lagoinha do leste	Jan 04-2016	61442	KY769846	/russula-lactarius
<i>Trechispora thelephora</i>	MVL 109	Morro da lagoa	fev 13-2016	61447	KY769868	-
<i>Trechispora thelephora</i>	MVL 113	Morro da lagoa	fev 13-2016	61448	-	-



**Figura 1:** Basidiomas potencialmente ectomicorrízicos coletados: A: MVL 74 *Clavulina* sp. B: MVL 65 *Amanita* sp. C: MLV 101 *Ramaria* sp. D: MVL 64 Entolomataceae sp. E: MVL 66 *Cantharellus* sp. Escalas: 1 cm.

**Tabela 2:** Fungos encontrados nas raízes

Fungo	Coleta	Localidade	Data	GenBank (ITS)
Ascomycota indet.	MVL R1	Morro da Lagoa	Nov 10-2015	KY769810
Mycenaceae indet.	MVL R2	Morro da Lagoa	Oct 06-2015	KY769811
Hydnodontaceae indet.	MVL R3	Morro da Lagoa	Oct 06-2015	KY769812

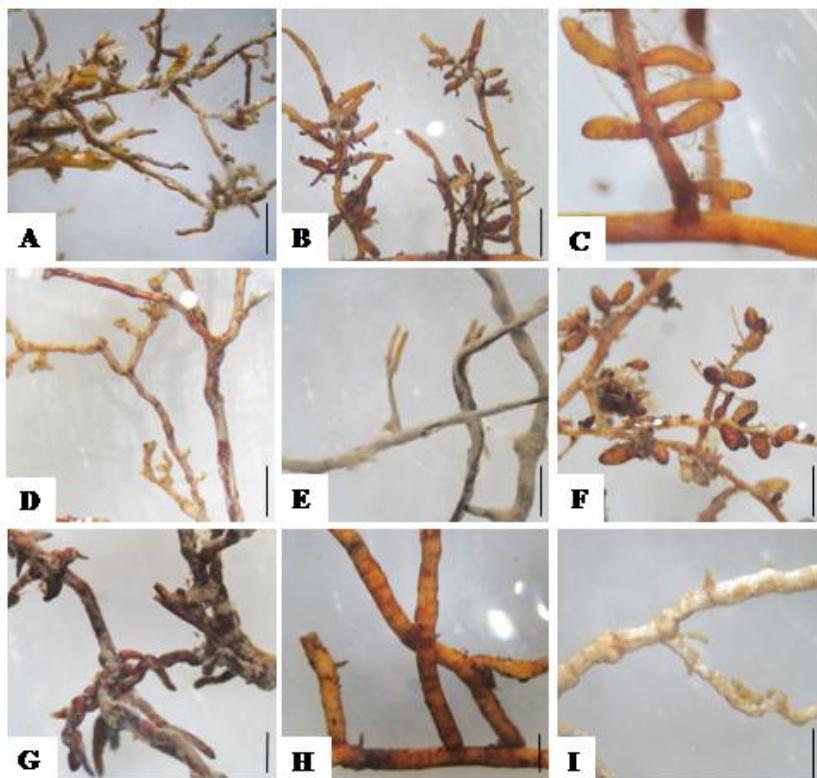
**Cont.**

<b>Fungo</b>	<b>Coleta</b>	<b>Localidade</b>	<b>Data</b>	<b>GenBank (ITS)</b>
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL R4	Morro da Lagoa	Oct 06-2015	KY769813
Ascomycota indet..	MVL R6	Morro da Lagoa	Nov 10-2015	KY769814
Clavariaceae indet.	MVL R9	Morro da Lagoa	Oct 06-2015	KY769815
Ascomycota indet.	MVL R10	Morro da Lagoa	Oct 06-2015	KY769816
Ascomycota indet.	MVL R12	Morro da Lagoa	Oct 06-2015	KY769817
Entolomataceae indet.	MVL R13	Morro da Lagoa	Oct 06-2015	KY769818
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL R14	Morro da Lagoa	Oct 06-2015	KY769819
<i>Trechispora</i> sp.	MVL R15	Dunas da lagoa	Oct 06-2015	KY769820
Xylariaceae sp.	MVL R17	Dunas da lagoa	Oct 06-2015	KY769821
<i>Oidiodendron</i> sp.	MVL R18	Dunas da lagoa	Sep 07-2015	KY769822
<i>Russula</i> sp.	MVL R20	Dunas da lagoa	Oct 06-2015	KY769823
Agaricaceae sp.	MVL R21	Dunas da lagoa	Sep 07-2015	KY769824
<i>Trechispora</i> sp.	MVL R23	Dunas da lagoa	Sep 07-2015	KY769825
Marasmiaceae indet.	MVL R24	Morro da Lagoa	Oct 06-2015	KY769826
Marasmiaceae indet.	MVL R32	Morro da Lagoa	Mar 18-2016	KY769827
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL R41	Morro da Lagoa	Fev 13-2016	KY769828
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL R42	Morro da Lagoa	Fev 13-2016	KY769829
<i>Lachnum virgineum</i>	MVL R43	Morro da Lagoa	Mar 18-2016	KY769830
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL R44	Morro da Lagoa	Mai 20-2016	KY769831
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL R45	Morro da Lagoa	Fev 13-2016	KY769832

## Simbiontes

**Tabela 3:** Famílias de plantas identificadas como possíveis simbiontes de fungos ectomicorrízicos na Mata Atlântica do sul do Brasil

<b>Coleta</b>	<b>Planta</b>	<b>Fungo</b>
MVL R9	Myrtaceae	Clavariaceae indet.
MVL R10	Anacardiaceae	Ascomycota indet.
MVL R14	Moraceae	<i>Lactifluus</i> sp.
MVL R18	Lauraceae	<i>Oidiodendron</i> sp.
MVL R20	Nyctaginaceae	<i>Russula</i> sp.
MVL R32	Sapindaceae	Marasmiaceae indet.



**Figura 2:** Morfotipos ectomicorrízicos identificados A: EcM morfotipo R1 Ascomycota. B: EcM morfotipo R12 Ascomycota. C: EcM morfotipo R13 Entolomataceae. D: EcM morfotipo R24 Marasmiaceae. E: EcM morfotipo R43 *Lachnum virgineum*. F: EcM morfotipo R9 Clavariaceae e Myrtaceae. G: EcM morfotipo R10 Ascomycota e Anacardiaceae. H: EcM morfotipo R18 *Oiodiodendron* e Lauraceae. I: EcM morfotipo R32 Marasmiaceae e Sapindaceae. Escalas: A, B, D, E, F, I: 3 mm. C, G, H: 2 mm.

## Referências

- Blackwell, M. (2000). Terrestrial Life--Fungal from the Start? *Science*, 289(5486), 1884-1885.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American journal of botany*, 98(3), 426-438.
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1, 48.
- Brearley, F. Q. (2012). Ectomycorrhizal associations of the Dipterocarpaceae. *Biotropica*, 44(5), 637-648.
- Cepero-de García, M. C., Restrepo, S., Franco-Molano, A. E., Cárdenas, M., & Vargas, N. (2012). *Biología de hongos. Bogotá: Uniandes*, 497.
- Courty, P. E., Buée, M., Diedhiou, A. G., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F., & Garbaye, J. (2010). The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 679-698.
- Giachini, A. J., Oliveira, V. L., Castellano, M. A., & Trappe, J. M. (2000). Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. *Mycologia*, 1166-1177.
- Halling, R. E. (2001). Ectomycorrhizae: co-evolution, significance, and biogeography. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 5-13.
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological research*, 95(6), 641-655.
- Heijden, M. G., Martin, F. M., Selosse, M. A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205(4), 1406-1423.

- Henkel, T. W., Terborgh, J., & Vilgalys, R. J. (2002). Ectomycorrhizal fungi and their leguminous hosts in the Pakaraima Mountains of Guyana. *Mycological Research*, 106(05), 515-531.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (2008). *Dictionary of the Fungi* CABI. Wallingford, UK.
- Moyersoen, B. (2012). Dispersion, an Important Radiation Mechanism for Ectomycorrhizal Fungi in Neotropical Lowland Forests?. INTECH Open Access Publisher.
- O'Brien, H. E., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo, J. M., & Vilgalys, R. (2005). Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 5544-5550.
- Rillig, M. C., & Mummey, D. L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171(1), 41-53.
- Rinaldi, A. C., Comandini, O., & Kuyper, T. W. (2008). Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity*, 33, 1-45.
- Roy, M., Schimann, H., Braga-Neto, R., Da Silva, R. A., Duque, J., Frame, D., Wartchow, F. & Neves, M. A. (2016). Diversity and Distribution of Ectomycorrhizal Fungi from Amazonian Lowland White-sand Forests in Brazil and French Guiana. *Biotropica*, 48(1), 90-100.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological research*, 105(12), 1413-1421.
- Simard, S. W., Durall, D. M. (2004). Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1140-1165.



Singer, R., Araujo, I., & Ivory, M. H. (1983). The ectotrophically mycorrhizal fungi of the neotropical lowlands, especially central Amazonia. (Litter decomposition and ectomycorrhiza in Amazonian forests 2.). *Beihefte zur Nova hedwigia*, (77).

Smith, M. E., Henkel, T. W., Uehling, J. K., Fremier, A. K., Clarke, H. D., & Vilgalys, R. (2013). The ectomycorrhizal fungal community in a Neotropical forest dominated by the endemic dipterocarp *Pakaraimaea dipterocarpacea*. *PLoS one*, 8(1), e55160.

Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.

Taylor, A. F., & Alexander, I. A. N. (2005). The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist*, 19(03), 102-112.

Tedersoo, L., May, T. W., & Smith, M. E. (2010a). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20(4), 217-263.

Tedersoo, L., Sadam, A., Zambrano, M., Valencia, R., & Bahram, M. (2010b). Low diversity and high host preference of ectomycorrhizal fungi in Western Amazonia, a Neotropical biodiversity hotspot. *The ISME journal*, 4(4), 465-471.

Yokomizo, N.K.S. (1986). *Micorrizas em essenciais florestas*. Anais da I reunião brasileira sobre micorrizas. Lavras, Brasil: UFLA, p. 112.

## Capítulo 1

### **Russulaceae: evidências morfológicas e moleculares de ectomycorrizas na Mata Atlântica**

Mary Luz Vanegas León

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

Aida Marcela Vasco Palácio

*Utrecht University, & the Fungal Biodiversity Centre CBS-KNAW, Utrecht, Holanda.*

Maria Alice Neves

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

### **Resumo**

Russulaceae é uma família ectomicorrízica taxonomicamente bem definida que compreende táxons com ampla distribuição mundial. Algumas espécies de *Russula*, *Lactarius* e *Lactifluus* já foram encontradas associadas com espécies de Fabaceae, Dipterocarpaceae, Nyctaginaceae e Polygonaceae na região amazônica de Venezuela, Brasil, Equador, Colômbia e Guiana. O objetivo do estudo foi comprovar a presença de associação ectomicorrízica de Russulaceae

com plantas da Mata Atlântica e ampliar o conhecimento sobre a diversidade de Russulaceae em uma área de floresta e uma área de restinga no sul do Brasil. Foram coletados basidiomas e raízes na Floresta Ombrófila Densa e na restinga, no domínio da Mata Atlântica. Das amostras fúngicas foi amplificada a região ITS e foram feitas análises de Inferência Bayesiana e Máxima verossimilhança. Os resultados mostram a presença de *Russula* e *Lactifluus* nas raízes. Os basidiomas coletados pertencem a *Russula*, *Lactarius* e *Lactifluus*. Para identificação das famílias das amostras vegetais, foi amplificada a região do gene *rbcL*. As famílias Nyctaginaceae e Moraceae foram identificadas como simbioses. A diversidade de fungos ectomicorrízicos na região é alta e ainda devem ser descritas as interações com simbioses e a taxonomia deve ser melhor estudada no futuro. Apesar da Mata Atlântica ser uma região com alta diversidade biológica, a maioria dos simbioses ectomicorrízicos já estudados em outras regiões do Neotrópico não estão presentes nas florestas da ilha de Santa Catarina. Por esta razão é possível que os fungos ectomicorrízicos de Russulaceae estejam associados a plantas ainda não descritas como formadoras de ectomicorrizas. Portanto é necessário aprofundar a busca das plantas que estão associadas e dessa forma compreender a dinâmica das comunidades fúngicas na Mata Atlântica do sul do Brasil.

**Palavras chave:** *Guapira opposita*, ITS, *Lactarius*, *Lactifluus*, Mata Atlântica, Restinga, *Russula*

## Introdução

A associação micorrízica é uma interação mutualística entre alguns fungos e as raízes das plantas (Smith & Read, 2008). Estes fungos ajudam a planta na absorção de água e nutrientes como fósforo, nitrogênio e carbono, e em troca, o fungo recebe polissacarídeos produzidos durante a fotossíntese (Halling, 2001; Brearley, 2012; Heijden *et al.*, 2015). Os fungos das associações ectomicorrízicas (EcM) são muito importantes na dinâmica das comunidades por permitirem a conexão entre plantas através do micélio associado às raízes (Heijden *et al.*, 2015). Esses fungos ajudam no estabelecimento de sementes, desenvolvimento de plântulas e protegem as plantas de patógenos radiculares (Smith *et al.*, 2013). EcM diferenciam-se dos outros tipos de micorrizas pela formação do manto de da rede de Hartig. Estima-se que as EcM evoluíram pelo menos 66 vezes a partir de ancestrais saprófitas, e incluem fungos dos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota (Tedersoo *et al.*, 2010a).

O estudo dos fungos ectomicorrízicos iniciou nas regiões temperadas da Europa e Norte América, em florestas onde predominam plantas das famílias Pinaceae, Betulaceae e Fagaceae. Por muito tempo, acreditava-se que as plantas das regiões tropicais não possuíam associações do tipo EcM, e que as associações de plantas com fungos eram principalmente do tipo micorrízica arbuscular (MA) (Andrade *et al.*, 2000; Henkel *et al.*, 2002; Courty *et al.*, 2010). Atualmente, sabe-se que na região Neotropical existe uma alta diversidade de fungos ectomicorrízicos, cujas associações conhecidas são com plantas dos gêneros *Dicymbe* Spruce ex Benth. e *Aldina* Endl. da família Fabaceae Lindl.;

*Pakaraimaea* Maguire & P.S.Ashton e *Pseudomonotes* A.C. Londoño, E. Alvarez D. & Forero da família Dipterocarpaceae; *Neea* Ruiz & Pav., *Guapira* Aubl. e *Pisonia* L. da família Nyctaginaceae; *Coccoloba* P. Browne da família Polygonaceae; e *Gnetum* L. da família Gnetaceae (Tedersoo *et al.*, 2010a; Tedersoo *et al.*, 2010b; Moyersoen, 2012; Smith *et al.*, 2013; Vasco-Palacio, 2016). Dentre esses gêneros, *Guapira opposita* (vell.) reitz pode ser encontrada comumente na Ilha de Santa Catarina, e em menor frequência, espécies de *Neea* e *Coccoloba* (D. Falkenberg, Comunicação pessoal, Agosto 2015).

Atualmente estão registradas 175 espécies de fungos EcM (Basidiomycota) em áreas de vegetação nativa em 23 dos 27 estados do Brasil, sendo mais frequentes ao longo do litoral (Roy *et al.*, 2016). Tradicionalmente, os estudos de fungos EcM no Brasil foram feitos com dados apenas dos basidiomas, considerando o conhecimento dos gêneros de fungos EcM já reportado em literatura, e poucos estudos foram feitos com raízes micorrizadas (Singer *et al.*, 1983; Yokomizo, 1986; Giachini *et al.*, 2000; Gurgel, 2008; Gurgel, 2009 Sulzbacher *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2016).

Russulaceae Lotsy é uma linhagem de espécies EcM que compreende quatro gêneros: *Russula* Pers., *Lactarius* Pers., *Lactifluus* (Pers.) Roussel e *Multifurca* Byuck & Hofstetter (Byuck *et al.*, 2008). Jaeger (2013) levantou um total de 27 espécies de *Russula*, 19 espécies de *Lactarius* e 10 espécies de *Lactifluus* nas regiões norte, nordeste, sudeste e sul do Brasil. Porém não há estudos das associações ectomicorrízicas da família com as plantas na Mata Atlântica. O

objetivo deste estudo foi comprovar a presença de associação ectomicorrízica de Russulaceae com plantas nativas da Mata Atlântica.

## **Materiais e Métodos**

A Ilha de Santa Catarina encontra-se localizada no litoral do estado de Santa Catarina, ao sul do Brasil e tem uma superfície de 523 Km<sup>2</sup>. A ilha está situada em uma região de Mata Atlântica, composta por três tipos de fisionomias: os manguezais, a restinga e a Floresta Ombrófila Densa (Woehl *et al.*, 2008). O clima é subtropical sem estação seca (Cfa segundo a classificação de Köppen). A temperatura e a precipitação média anual é 20 °C e 1500 mm (Lingner *et al.*, 2013). O verão (Dezembro-Fevereiro) é a estação com maior índice pluviométrico, enquanto que nos meses de junho e agosto são registados os menores índices pluviais do ano.

Foram coletadas amostras de solo contendo sistema radicular de plantas uma vez por mês entre setembro de 2015 e maio de 2016 no Parque das Dunas da Lagoa da Conceição e no Morro da Lagoa, perto de 10 árvores marcadas de *G. opposita* (5 árvores no Morro da Lagoa e 5 nas dunas). As amostras foram acondicionadas em sacos *ziploc* para evitar a perda de água. No laboratório as raízes foram lavadas com água da torneira, observadas e triadas sob o microscópio estereoscópico. As EcM foram reconhecidas pela presença de manto ou por modificações da raiz (e.g., ausência de pelos absorventes, engrossamento das raízes terciárias ou mudança de cor) e então morfotipadas (Smith *et al.*, 2013). Os morfotipos de EcM foram fotografados e desidratados em sílica gel para os estudos moleculares.

Coletas de basidiomas foram feitas de forma oportunista entre Outubro de 2015 e Janeiro de 2016 em quatro áreas de Floresta Ombrófila Densa: Morro da Lagoa, Unidade de Conservação Ambiental Desterro (UCAD), trilha de Naufragados, e trilha da Lagoinha do Leste-Pântano do sul; e duas áreas de restinga: Lagoa do Peri e Dunas da Lagoa da Conceição. Os basidiomas coletados foram desidratados usando métodos tradicionais em estudos taxonômicos de micologia (Largent *et al.*, 1977). Microscópicamente, foram observados os esferocistos e esporos. O reagente de Melzer foi utilizado para observar a reação amiloide na ornamentação dos esporos. As amostras foram tombadas e depositadas no herbário FLOR da Universidade Federal de Santa Catarina.

A extração de DNA dos basidiomas foi feita com o protocolo de Doyle & Doyle (1987) modificado por Góes-Neto *et al.* (2005) a partir de fragmentos do basidioma conservados em CTAB. Na extração de DNA das raízes micorrizadas foi usado o Precellys 24 (BioAmerica Inc) para macerar os tecidos. O DNAeasy Plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) foi usado seguindo as indicações do fabricante, porém no passo 10 só foram adicionados 50 µl do AE buffer para obter uma concentração de DNA maior.

O ITS (*internal transcribed spacer* do rDNA) foi amplificado com os primers especificamente desenvolvidos para fungos ITS1F e ITS4 (White *et al.*, 1990; Gardes & Bruns, 1993). O volume final da reação foi de 30 µl: 15 µl do Master mix Promega®, 1 µl de cada primer (10 pMol) e 13 µl da diluição de DNA. O programa usado no termociclador teve a desnaturação inicial (5min 95°C), 35 ciclos (30s 95 °C; 30s 61 °C; 1 min 72 °C) e uma extensão final (5 min 72°C).

A partir do DNA total das raízes foi amplificada a região *rbcl* (*Ribulose biphosphate carboxylase large chain*) com os *primers* *rbcl-1F* e *rbcl-724R* (Fay *et al.*, 1997) a fim de identificar a planta associada. Todos os produtos de PCR foram observados em gel de agarose 1% e purificados usando o protocolo de polietileno glicol. O sequenciamento foi feito no centro de pesquisa Renné Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) em Belo Horizonte/MG.

As sequências foram curadas no software Geneious v. 6.1.8 (Kearse *et al.*, 2012). Sequências de raízes e basidiomas neotropicais e sequências referência (basidiomas identificados por especialistas) de Russulaceae disponíveis na plataforma UNITE foram usadas na construção do alinhamento (Apêndice I). O grupo externo escolhido foi *Gloeocystidiellum aculeatum* (Gloeocystidiellaceae). O alinhamento da matriz foi feito no software MAFFT v7 (Katoh & Standley 2013) e depois curado manualmente com os softwares MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) e AliView v1.18 (Larson, 2014). Os modelos de substituição nucleotídica foram estimados usando o critério de informação de Bayesiano (BIC) em jModelTest v2.1.6 (Posada, 2008) disponível na plataforma CIPRES *Science Gateway* (Miller *et al.*, 2010, <https://www.phylo.org/>).

As análises de inferência bayesiana (IB) foram feitas usando MrBayes v3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), disponível em CIPRES. Foram feitas 2 corridas de 20 milhões de gerações, 4 cadeias de MCMC e *burn-in* de 25%. A matriz foi particionada em três, sendo as partições ITS1, 5.8s e ITS2. As taxas de substituição nucleotídica foram estimadas e informadas como *prior* da função Dirichlet. As análises de



máxima verossimilhança (ML) foram feitas com RAxML v 8.1.24 (Stamatakis, 2014), disponível em CIPRES. O modelo de substituição usado foi o GTRCAT e os valores de sustentação sendo acessados através de 500 pseudoreplicações - *bootstrap* (BS).

As árvores geradas foram editadas no software FigTree v1.0.4. (Rambaut, 2012). Valores de IB com uma probabilidade posterior (PP)  $\geq 0,95$  e valores de ML *bootstrap* (BS)  $\geq 90$  foram considerados altamente sustentados. PP  $\geq 0,9$  e menor que 0,95 e BS  $\geq 70$  e menor que 90 são considerados com sustentação moderada.

## **Resultados**

Durante outubro, fevereiro e maio foi observado o maior número de EcM nas raízes. Em novembro, dezembro e janeiro, que correspondem à época de maior precipitação, não foram encontrados EcM nas raízes. Neste estudo foram feitas 15 coletas que pertencem à família Russulaceae, sete pertencem ao gênero *Lactifluus*, dois ao gênero *Lactarius* e seis ao gênero *Russula*. Nas raízes foram identificados 48 morfotipos e foram obtidas 23 sequências, destas, sete pertencem à Russulaceae.

### *Análises filogenéticas*

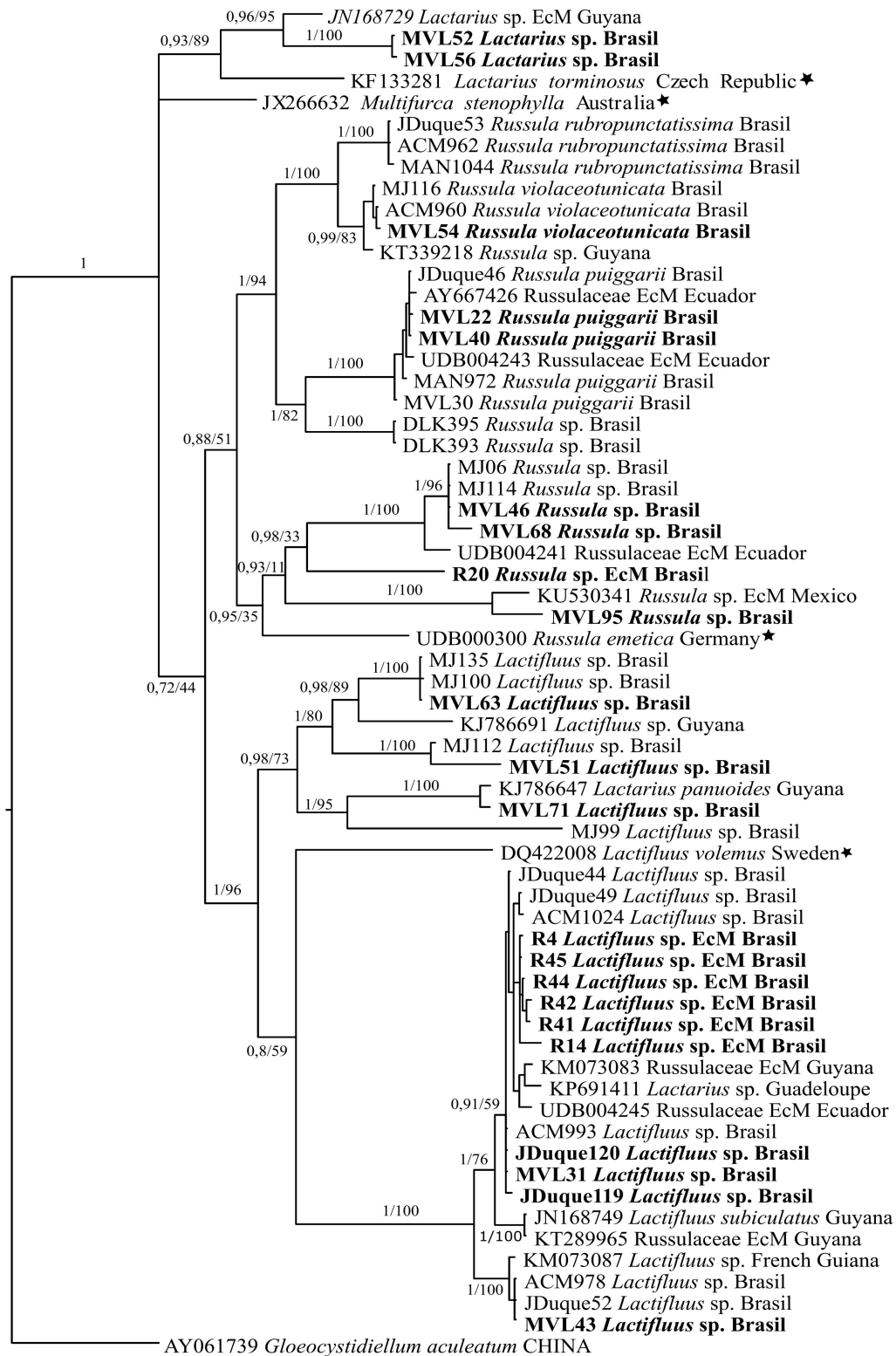
As análises filogenéticas feitas com inferência Bayesiana (Figura 1) e Máxima verossimilhança (Apêndice II) apresentaram topologias semelhantes, porém as árvores feitas com Inferência Bayesiana apresentam valores de sustentação maiores, por esta razão só apresentaremos essa análise, incluindo também os valores de *bootstrap*. A reconstrução filogenética apresenta Russulaceae como monofilética

(PP=1). Dentro da família o gênero *Lactifluus* tem uma alta sustentação (PP=1 BS=96) sendo o grupo irmão do gênero *Russula*, fracamente sustentado (PP=0,88 BS=51). Não foi possível determinar as relações de *Russula* e *Lactifluus* com *Multifurca* e *Lactarius*.

Dentro de *Russula* está o morfotipo ectomicorrízico R20, proximamente relacionado a um morfotipo EcM do Equador (UDB004241) e de uma espécie nova de *Russula* coletada na ilha de Santa Catarina (informação não publicada). A coleta MVL 95 formou um clado com uma sequência não identificada de EcM do México (KU530341) (PP=1 BS=100). Os outros clados dentro do gênero apresentam algumas espécies já conhecidas como *R. puiggarii*, *R. violaceotunicata* e *R. rubropunctatissima*. Os morfotipos R4, R14, R41, R42, R44 e R45 pertencem ao gênero *Lactifluus* e aparecem relacionados com outros espécimes coletados no Brasil, Guiana, Guadalupe e Equador. Em *Lactarius* foram recuperados os espécimes MVL 52 e MVL 56.

#### *Morfologia das raízes*

O morfotipo R20 foi coletado nas dunas da Lagoa da Conceição, possui raízes longas e um manto fino marrom cobrindo parcialmente a superfície da raiz. Os morfotipos de *Lactifluus* foram coletados no Morro da Lagoa e compreendem duas morfologias. A primeira caracteriza-se por um manto amarelado algodoado cobrindo a superfície de raízes longas (R4, R41, R42, R44). A segunda morfologia caracteriza-se pela presença de ramificações (*tips*) abundantes, curtas e



**Figura 1:** Árvore de Inferência Bayesiana baseada em análise do ITS de espécimes neotropicais de Russulaceae. Valores de sustentação são apresentados nos ramos. (PP/BS). Coletas analisadas neste estudo são realçadas em negrito. \*Sequências de referência.

engrossadas, de cor marrom ou amarelada, sem manto ou com uma capa muito fina e irregular de micélio (R14, R45) (Figura 2).

### *Simbiontes*

As raízes que foram sequenciadas com sucesso com os *primers* para plantas foram duas, EcM R20 e EcM R14. A EcM R20 pertence a *Guapira opposita* (Vell.) Reitz, que seria o simbionte de *Russula* sp. Das EcM associadas a *Lactifluus* a sequência de R14 pertence a Moraceae Gaudich. No Morro da Lagoa há registro de sete espécies em quatro gêneros da família (*Dorstenia* L, *Ficus* L, *Maclura* Nutt e *Sorocea* A.St.-Hil.), não foi possível identificar qual deles seria o simbionte (INCT, 2016).



**Figura 2:**A: MVL52 *Lactarius* sp.B: MVL63 *Lactifluus* SP.C: MVL68 *Russula* sp. D: EcM morfotipo R20. E: EcM morfotipo R4. F: EcM morfotipo R14. Escala: A: 1 cm. B, C: 2 cm. D, E, F: 2 mm.

## Discussão

As espécies de *Russula* e *Lactifluus* fazem associações ectomicorrízicas na Mata Atlântica. O morfotipo R20 é uma associação entre *Russula* e *Guapira opposita*, que é a única espécie de Nyctaginaceae registrada nas dunas da Lagoa da Conceição. Há registros de *Guapira* e *Neea* (Nyctaginaceae) fazendo associações com membros de *Russula* e *Lactarius* também na floresta amazônica equatoriana (Haug *et al.*, 2005; Tedersoo *et al.*, 2010b). Haug *et al.* (2005) observaram que além da associação com Russulaceae, *Guapira* e *Neea* estão associadas com fungos da família Thelephoraceae, os quais não foram encontrados neste estudo.

O morfotipo R14 pertence a *Lactifluus* e foi encontrado associado a uma espécie de Moraceae. Nenhuma espécie de Moraceae tem registro como simbionte ectomicorrízico, porém, foram encontradas hifas com fíbulas em *Brosimum lactescens* (S. Moore) C.C. Berg. Entretanto o estudo anatômico da raiz mostrou ausência de rede de Hartig e de manto e por isso não se pode confirmar a associação ectomicorrízica (Andrade *et al.*, 2000). Para Mata Atlântica ainda não existem estudos das plantas que fazem associações ectomicorrízicas e é importante esclarecer se alguma espécie de Moraceae está associada a *Lactifluus* ou a outros membros da família Russulaceae, ou se as hifas estavam apenas sobre a raiz, sem fazer uma associação verdadeira.

Os estudos de fungos ectomicorrízicos feitos na região Neotropical mostram que os membros de Russulaceae estão associados com diversos simbiontes. Nas florestas monodominantes de *Dicymbe corymbosa* Spruce ex Benth. foram encontradas 20 espécies de *Russula*

e nove de *Lactarius* (Henkel *et al.*, 2011). *Pakaraimaea dipterocarpacea* Maguire & P.S. Ashton e *Dicymbe jenmanii* Sandwith foram encontradas associando-se com espécies de *Russula* e *Lactarius* (Smith *et al.*, 2013). Na floresta amazônica equatoriana foram encontrados morfotipos ectomicorrízicos de Russulaceae associados com *Coccoloba* sp. (Tedersoo *et al.*, 2010b). Na amazônia colombiana foram encontradas raízes micorrizadas de *Russula* e *Lactifluus* associadas com *Pseudomonotes* sp. e *Dicymbe uaiparuensis* (Cowan) (Vasco-Palacio, 2016).

Entender as associações dos fungos e plantas em lugares que apresentam uma alta diversidade como a Mata Atlântica é um desafio. Muitas espécies necessitam ser descritas, os simbiontes ainda não estão identificados e as raízes têm diferenças morfológicas marcantes quando comparadas às micorrizas clássicas das regiões temperadas e boreais. O Neotrópico é uma região heterogênea, com histórias e processos evolutivos e biogeográficos diferentes, com uma diversidade de fungos ectomicorrízicos ainda desconhecida e muitas interações a serem descobertas.

As regiões tropicais e subtropicais são consideradas como tendo pouca diversidade de fungos EcM, mas provavelmente isso pode ser explicado pela hipótese de baixa densidade populacional dos simbiontes (Peay & Matheny, 2016). Nas florestas tropicais a diversidade de plantas é muito alta e a maioria das espécies fazem associações do tipo MA (Andrade *et al.*, 2000). Entretanto Russulaceae é uma linhagem amplamente distribuída, encontra-se associada com diversos simbiontes e acredita-se que é uma das linhagens ectomicorrízicas mais antigas (Peay &

Matheny, 2016). Embora os simbiontes tradicionalmente reconhecidos na literatura não estejam presentes na Mata Atlântica, neste trabalho foi demonstrada a presença de basidiomas e ectomicorrizas de Russulaceae. Russulaceae, nesses ambientes, pode estar associada a outros simbiontes ainda não descritos como ectomicorrízicos.

## Referências

Andrade, A. C. S., Queiroz, M. H., Hermes, R. A. L., & Oliveira, V. L. (2000). Mycorrhizal status of some plants of the Araucaria forest and the Atlantic rainforest in Santa Catarina, Brazil. *Mycorrhiza*, 10(3), 131-136.

Brearley, F. Q. (2012). Ectomycorrhizal associations of the Dipterocarpaceae. *Biotropica*, 44(5), 637-648.

Buyck, B., Hofstetter, V., Eberhardt, U., Verbeken, A., & Kauff, F. (2008). Walking the thin line between *Russula* and *Lactarius*: the dilemma of *Russula* subsect. *Ochricompactae*. *Fungal Diversity*, 28, 15-40.

Courty, P. E., Buée, M., Diedhiou, A. G., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F., & Garbaye, J. (2010). The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 679-698.

Doyle, JJ & Doyle, JL. (1987). A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemical Bulletin*: 19:11-15.

Fay, M. F., Cameron, K. M., Prance, G. T., Lledó, M. D., & Chase, M. W. (1997). Familial relationships of *Rhabdodendron* (Rhabdodendraceae): plastid *rbcL* sequences indicate a caryophyllid placement. *Kew Bulletin*, 923-932.

Gardes, M. & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*. 2 (2) 113-118.

Giachini, A. J., Oliveira, V. L., Castellano, M. A., & Trappe, J. M. (2000). Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. *Mycologia*, 1166-1177.

Góes-Neto, A; Loguercio-Leite, C & Guerrero, Rt. (2005). DNA extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas*: 18(2): 19 – 32.

Gurgel, F. E., Silva, B. D. B., & Baseia, I. G. (2008). New records of *Scleroderma* from Northeastern Brazil. *Mycotaxon*.

Gurgel, F. E. (2009). Fungos ectomicorrízicos em áreas de Mata Atlântica do Nordeste do Brasil.

Halling, R. E. (2001). Ectomycorrhizae: co-evolution, significance, and biogeography. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 5-13.

Henkel, T. W., Aime, M. C., Chin, M. M., Miller, S. L., Vilgalys, R., & Smith, M. E. (2012). Ectomycorrhizal fungal sporocarp diversity and discovery of new taxa in *Dicymbe* monodominant forests of the Guiana Shield. *Biodiversity and Conservation*, 21(9), 2195-2220.

Haug, I., Weiß, M., Homeier, J., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2005). Russulaceae and Thelephoraceae form ectomycorrhizas with members of the Nyctaginaceae (Caryophyllales) in the tropical mountain rain forest of southern Ecuador. *New Phytologist*, 165(3), 923-936.

Heijden, M. G., Martin, F. M., Selosse, M. A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205(4), 1406-1423.

Henkel, T. W., Terborgh, J., & Vilgalys, R. J. (2002). Ectomycorrhizal fungi and their leguminous hosts in the Pakaraima Mountains of Guyana. *Mycological Research*, 106(05), 515-531.

INCT - Virtual Herbarium of Flora and Fungi. Gaps in Knowledge of Flora and Fungi of Brazil. Disponível em: <<http://www.splink.org.br/index?lang=pt>>. Acesso em: 29 Nov. 2016.



- Jaeger, M. (2013). Diversidade de Russulaceae para o Brasil. Disertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em biologia vegetal. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S. & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Largent, D.L., Johnson, D., Watling, R. (1977). How to identify mushrooms to genus III: microscopic features. Mad River Press Inc., Eureka Printing Co. Inc. California.
- Lingner, D.V., Sevegnani, L., Gasper, A.L. de, Uhlmann, A., Vibrans, A.C. (2013) Grupos florísticosestruturais da Floresta Ombrófila Densa em Santa Catarina. In: Vibrans AC, Sevegani L, Gasper AL de, Lingner DV (Eds) Volume IV - Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina. Floresta Ombrófila Densa. Edifurb, Blumenau, 141–155.
- Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics* 30(22): 3276-3278.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010, November). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 2010 (pp. 1-8). IEEE.
- Moyersoen, B. (2012). Dispersion, an Important Radiation Mechanism for Ectomycorrhizal Fungi in Neotropical Lowland Forests?. INTECH Open Access Publisher.
- Peay, K. G., & Matheny, P. B. (2016). The biogeography of ectomycorrhizal fungi—a history of life in the subterranean. *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, 341-361.

- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, 25(7), 1253-1256.
- Rambaut, A. (2012). FigTree version 1.4. 0. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574.
- Roy, M., Schimann, H., Braga-Neto, R., Da Silva, R. A., Duque, J., Frame, D., Wartchow, F. & Neves, M. A. (2016). Diversity and Distribution of Ectomycorrhizal Fungi from Amazonian Lowland White sand Forests in Brazil and French Guiana. *Biotropica*, 48(1), 90-100.
- Singer, R., Araujo, I., & Ivory, M. H. (1983). The ectotrophically mycorrhizal fungi of the neotropical lowlands, especially central Amazonia. (Litter decomposition and ectomycorrhiza in Amazonian forests 2.). *Beihefte zur Nova hedwigia*, (77).
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.
- Smith, M. E., Henkel, T. W., Uehling, J. K., Fremier, A. K., Clarke, H. D., & Vilgalys, R. (2013). The ectomycorrhizal fungal community in a Neotropical forest dominated by the endemic dipterocarp *Pakaraimaea dipterocarpacea*. *PLoS one*, 8(1), e55160.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Sulzbacher, M. A., Giachini, A. J., Grebenc, T., Silva, B. D., Gurgel, F. E., Loiola, M. I., ... & Baseia, I. G. (2013). Survey of an ectotrophic sand dune forest in the northeast Brazil. *Mycosphere*, (6), 1106-1115.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.

Tedersoo, L., May, T. W., & Smith, M. E. (2010a). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20(4), 217-263.

Tedersoo, L., Sadam, A., Zambrano, M., Valencia, R., & Bahram, M. (2010b). Low diversity and high host preference of ectomycorrhizal fungi in Western Amazonia, a neotropical biodiversity hotspot. *The ISME journal*, 4(4), 465-471.

Vasco-Palacio A.M. (2016). Ectomycorrhizal fungi in Amazonian tropical forests in Colombia. Ph.D. Thesis; Fungal Biodiversity Centre (CBS) and Utrecht University. Editorial Panamericana, Bogotá, Colombia.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315–322, in *PCR protocols: a guide to methods and application*. (eds.) M. Innis, D. Gelfand, J., and T. White Academic Press, San Diego.

Woehl Jr, G., Nishimura, W. E., Kamchen, S. 2008. *Mata Atlântica: essencial para a vida*. Instituto Rã-bugio para Conservação da Biodiversidade. Cartilha. ISBN 978-85-61891-02-2.

Yokomizo, N.K.S. 1986. *Micorrizas em essenciais florestas*. Anais da I reunião brasileira sobre micorrizas. Lavras, Brasil: UFLA, p. 112.

## Apêndice I

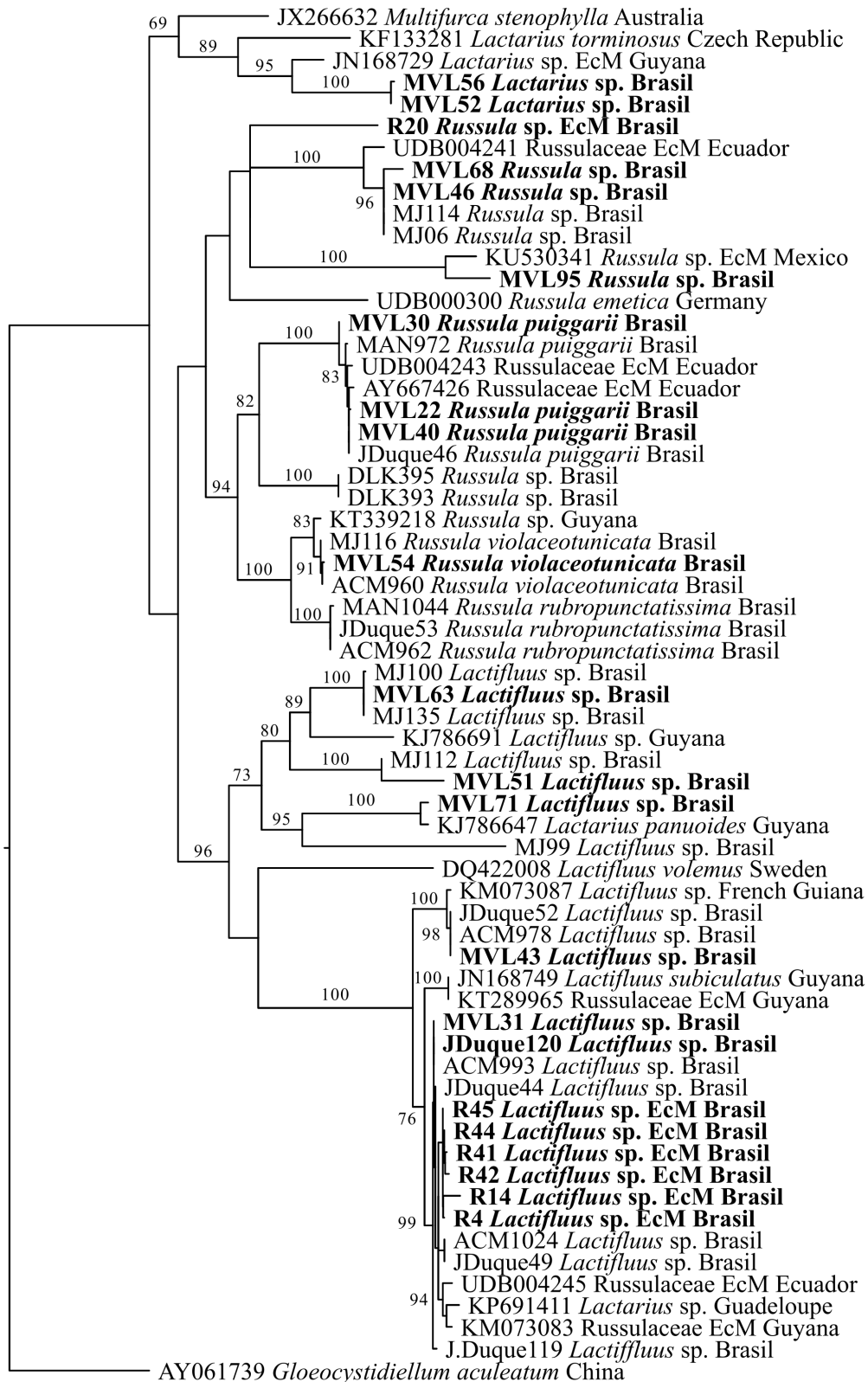
<b>Taxa</b>	<b>Voucher</b>	<b>Pais</b>	<b>GenBank ITS</b>	<b>Origem</b>
<i>Gloeocystidiellum aculeatum</i>	EL	China	AY061739	Basidioma
<i>Lactarius panuoides</i>	G128	Guyana	KJ786647	Basidioma
<i>Lactarius</i> sp.	ECM1066	Guyana	JN168729	EcM
<i>Lactarius</i> sp.	MVL 56	SC Brasil	KY769847	Basidioma
<i>Lactarius</i> sp.	MVL52	SC Brasil	KY769845	Basidioma
<i>Lactarius</i> sp.	Guad11-017	Guadeloupe	KP691411	Basidioma
<i>Lactarius torminosus</i>	RW3183	Czech Republic	KF133281	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL 31	SC Brasil	KY769836	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL 43	SC Brasil	KY769840	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL 51	SC Brasil	KY769844	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL 63	SC Brasil	KY769851	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	MVL 71	SC Brasil	KY769855	Micelio
<i>Lactifluus</i> sp.	JDuque 119	SC Brasil	KY769866	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	R4	SC Brasil	KY769813	EcM
<i>Lactifluus</i> sp.	R14	SC Brasil	KY769819	EcM
<i>Lactifluus</i> sp.	R41	SC Brasil	KY769828	EcM
<i>Lactifluus</i> sp.	R42	SC Brasil	KY769829	EcM
<i>Lactifluus</i> sp.	R44	SC Brasil	KY769831	EcM
<i>Lactifluus</i> sp.	R45	SC Brasil	KY769832	EcM
<i>Lactifluus</i> sp.	G4727	French Guiana	KM073087	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	JDuque 44	Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	JDuque 49	Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	JDuque 52	Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	ACM 1024	Brasil	TBP*	Basidioma

**Cont. Apêndice I**

<b>Taxa</b>	<b>Voucher</b>	<b>Pais</b>	<b>GenBank ITS</b>	<b>Origem</b>
<i>Lactifluus</i> sp.	ACM 993	Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	ACM 978	Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	MJ 135	Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	MJ 100	SC Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	MJ 99	SC Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	JDuque 120	SC Brasil	KY769867	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	G3144	Guyana	KJ786691	Basidioma
<i>Lactifluus</i> sp.	MJ 112	Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Lactifluus subiculatus</i>	TH7922	Guyana	JN168749	Basidioma
<i>Lactifluus volemus</i>	UE09.08.2004-5	Sweden	DQ422008	Basidioma
<i>Multifurca stenophylla</i>	TL2335	Australia	JX266632	Basidioma
<i>Russula puiggarii</i>	JDuque 46	Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Russula puiggarii</i>	MAN 972	RJ Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Russula puiggarii</i>	MVL 22	SC Brasil	KY769834	Basidioma
<i>Russula puiggarii</i>	MVL 30	SC Brasil	KY769835	Basidioma
<i>Russula puiggarii</i>	MVL 40	SC Brasil	KY769837	Basidioma
<i>Russula rubropunctatissima</i>	JDuque 53	Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Russula rubropunctatissima</i>	ACM 962	Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Russula rubropunctatissima</i>	MAN 1044	SC Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Russula</i> sp.	MVL 95	SP Brasil	KY769864	Basidioma
<i>Russula</i> sp.	TH9230	Guyana	KT339218	Basidioma
<i>Russula</i> sp.	MVL 68	SC Brasil	KY769854	Basidioma
<i>Russula</i> sp.	R20	SC Brasil	TBP*	EcM

**Cont. Apêndice I**

<b>Taxa</b>	<b>Voucher</b>	<b>Pais</b>	<b>GenBank ITS</b>	<b>Origem</b>
<i>Russula</i> sp.	DKL 395	Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Russula</i> sp.	DKL 393	Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Russula</i> sp.	MJ 114	SC Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Russula</i> sp.	MVL 46	SC Brasil	KY769842	Basidioma
<i>Russula</i> sp.	MJ 06	SC Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Russula violaceotunicata</i>	MVL 54	SC Brasil	KY769846	Basidioma
<i>Russula violaceotunicata</i>	ACM 960	Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Russula violaceotunicata</i>	MJ 116	SC Brasil	TBP*	Basidioma
<i>Russula emetica</i>	lw081	Germany	UDB000300	Basidioma
Russulaceae sp.	L6171_Russ_Y 04	Ecuador	UDB004243	EcM
Russulaceae sp.	305-6	Ecuador	AY667426	EcM
Russulaceae sp.	L6145c_Russ_ Y06	Ecuador	UDB004245	EcM
Russulaceae sp.	G4836	Guyana	KM073083	EcM
Russulaceae sp.	65W_4b	Guyana	KT289965	EcM
Russulaceae sp.	6Col1	Mexico	KU530341	EcM
Russulaceae sp.	L6157_Russ_Y 02	Ecuador	UDB004241	EcM



0.09

**Apêndice II:** Árvore de máxima verossimilhança baseada em análise do ITS de espécimes neotropicais de Russulaceae. Coletas realizadas neste estudo são realçadas em negrito. \*Sequências de referência.

## Capítulo 2

### *Trechispora*: a genus with ectomycorrhizal species

Mary Luz Vanegas León

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

Marcelo A. Sulzbacher

*Departamento de solos, Universidade Federal de Santa Maria, CCR Campus universitário 971050-900, Santa Maria, Rio grande do sul, Brazil*

Andrea Rinaldi

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Cagliari, Monserrato, Italy*

MarcAndre Selosse

*Muséum National d'Histoire Naturelle, France*

Maria Alice Neves

*Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.*

### **Abstract**

*Trechispora* (Hydnodontaceae) is considered a soil-inhabiting or white-rot decomposer. However, some species in the genus have some typical features of ectomycorrhizal fungi, such as basidiomes growing in soil, rhizomorphs present, and difficulty in germinating spores on common malt agar. Ectomycorrhizal basidiomes are frequently collected in neotropical and subtropical region, but taxonomical information and DNA sequences of root fungi and basidiomes in native Atlantic forest



are poorly known. Basidiomes and samples of soil and roots were collected in Florianópolis Brazil. Barcoding sequences of the ITS region were obtained for molecular analyzes. The molecular data was evaluated by maximum likelihood and Bayesian analyses. Phylogenetic analysis showed that *Trechispora* has some ectomycorrhizal fungi species. Two root sequences correspond to *Trechispora* genus. Other morphotype belongs to Hydnodontaceae. *Trechispora thelephora* is reported for the first time for Santa Catarina State. Traditionally, *Trechispora* is classified as saprophytic fungi, yet molecular analyses with environment samples from the Atlantic forest in Brazil revealed a rare lineage of EcM fungi. Our find showed that subtropical regions have different ectomycorrhizal species compared to tropical and temperate north regions, where ectomycorrhizal fungi have been mostly studied. This information demonstrates that soils are a diverse ecosystem for fungi. Soil fungi have still many interactions to be described.

**Keywords:** Atlantic rain forest, Ectomycorrhizal fungi, ITS, Phylogenetic analysis, Southern Brazil.

## **Introduction**

*Trechispora* P. Karst. (1980) belongs to Hydnodontaceae (Trechisporales) and includes about 46 species worldwide (Kirk *et al.*, 2008). *Trechispora* basidiomes are resupinate, effuse-reflexed or stipitate-pileate; exhibit a wide range of hymenophore configurations (smooth, hydroid and poroid representatives) and the hyphal system can be monomitic or dimitic. Micromorphological features include clamp connections, a fragile context, absence of cystidia and ellipsoid, usually ornamented, spores (Liberta, 1973; Larsson, 1994; 1996). *Trechispora*

has been traditionally considered a white-rot decomposer or soil-inhabiting fungus. However, Dunham *et al.* (2007) reported *Trechispora* mycelium associated with a root, indicating a possible ectomycorrhizal association.

Ectomycorrhizal (EcM) fungi are important in the ecosystems due their mutualistic association with some groups of plants. In the ectomycorrhizal-plant association the fungi provide water and nutrients such as phosphorus, nitrogen and carbon while the plant provides polysaccharides (Smith & Read, 2008; Halling, 2001; Heijden *et al.*, 2015). EcM fungi promote nutrients interchange between plants through the mycelium (Buée *et al.*, 2009), help the establishment of seed and seedling development and protect plants from root pathogens (Tedersoo *et al.*, 2010a). Most studies with EcM fungi are in the boreal and northern temperate regions where EcM fungi are associated with Pinaceae, Betulaceae and Fagaceae. Recently tropical regions began to be explored and the most representative EcM plants are *Guapira* Aubl., *Neea* Ruiz & Pav., *Pisonia* L. (Nyctaginaceae); *Aldina* Endl., *Dicymbe* Spruce ex Benth. (Fabaceae), *Pakaraimaea* Maguire & P.S. Ashton (Dipterocarpaceae); *Coccoloba* P. Browne (Polygonaceae) and *Gnetum* L. (Gnetaceae) (Haug *et al.* 2005; Wang & Qiu, 2006; Moyersoen 2006; Suvi *et al.*, 2010 Tedersoo *et al.*, 2010b; Henkel *et al.*, 2012; Suur, 2013; Alvarez-Manjarrez *et al.*, 2016).

The first studies with EcM fungi and plants included tracking the mycelium from the basidiomes to the roots, comparing hyphae found on the roots with the ones on the basidiomes, and seed germination experiments in the presence or absence of EcM fungi (Tedersoo *et al.*

2010a). Most EcM fungi studies use metagenomics and next-generation sequencing of environmental samples (roots and soil). The internal transcribed spacer (ITS rDNA) is the official barcoding sequence for fungi (Schoch *et al.*, 2012) and is widely used in fungi molecular ecology studies (Haug *et al.*, 2005; Wang & Qiu, 2006; Suvi *et al.*, 2010; Alvarez-Manjarrez *et al.*, 2016). Species identification can be achieved through specialized databases such as PlutoF workbench (Abarenkov *et al.*, 2010). However, many EcM fungal taxa found as environmental sequences do not match basidiomes sequences or pure cultures on this database. The lack of congruence is most possibly caused by the limited knowledge of tropical and subtropical fungi (Tedersoo *et al.*, 2010a; Hibbett *et al.*, 2011; Tedersoo & Smith, 2013). Published phylogenetic analysis based on ITS identified 78-82 distinct EcM lineages in Ascomycota, Basidiomycota and Zygomycota phyla, some are rare or geographically restricted (Tedersoo & Smith, 2013).

There are 175 species of EcM fungi (Basidiomycota) registered in Brazilian native forests (Roy *et al.*, 2016). EcM diversity knowledge in Brazil comes from basidiomes deposited in herbaria and classical taxonomy works. All published studies using environment samples (roots or soil) were made on pines and eucalyptus plantations (Yokomizo, 1986; Giachini *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2000; Giachini *et al.* 2004). The diversity of the EcM associated to native plant roots in the Atlantic Forest remains unknown. The principal objective of this study was to propose *Trechispora* subtropical species as a new EcM fungi lineage.

## Materials and Methods



Study sites are located in the east of the Santa Catarina island, municipality of Florianópolis, state of Santa Catarina. The samples were collected in two localities: Morro da Lagoa (defined as atlantic rain forest; S27° 35' 20'' W48° 28' 23') and dunas da Lagoa da Conceição (white sand dunes *restinga*; S27° 36' 47'' W48° 27' 10') (Woehl *et al.* 2008). Collections were made once a month from September 2015 to June 2016. We established five collection points in each locality next to *Guapira opposita* trees. 500 g of soil with roots were collected in each point (Smith *et al.*, 2013). In total we collected 10 soil samples per month. Samples were packed in plastic bags to prevent desiccation. In the laboratory, roots were washed with tap water and root tips were observed using a dissecting microscope. EcM were recognized by the hyphal mantle and root modifications. EcM morphotypes were photographed and then dried in silica gel. Basidiomes were collected randomly around the same spots. The specimens were taken to mycology laboratory where they were dehydrated and studied microscopically. Collected basidiomes were deposited in FLOR herbarium.

DNA was isolated from dried EcM and basidiomes. Root samples were disrupted using Precellys 24 (BioAmerica Inc). DNA was extracted with DNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen,Hilden, Germany) according to the

manufacturer's instructions, but only 50 µl of AE buffer was added in the step 10 to obtain higher final DNA concentration. DNA basidiomes was extracted according to Doyle & Doyle (1987) modified by Góes-Neto *et al.* (2005). Nuclear ITS (internal transcribed spacer) was amplified with primers ITS1F and ITS4 (White *et al.*, 1990; Gardes & Bruns, 1993). PCR final reaction volume was 30 µl and consisted of 15 µl of Master mix Promega®, 1 µl of each primer (10 pMol) and 13 µl of DNA 1:10 dilution. DNA were submitted to initial denaturation (5 min 95°C) then 35 amplification cycles (30 s 95 °C, 30 s 61 °C, 1 min 72 °C) and a final extension (5 min 72°C). PCR products were observed in 1 % agarose gels. The PCR products were purified using polyethylene glycol protocol. Sequencing was performed in the Renné Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) investigation center (Belo Horizonte/MG).

Sequence editing was done with Geneious, v6.8 (Kearse *et al.* 2012). Newly generated sequences were aligned with published sequences from GenBank and UNITE database and two Brazilian sequences from sclerotium were included in the analysis. (Table 1) using software MAFFT v7 (Kato & Standley 2013). Manual adjustment was performed in MEGA 6.06 (Tamura *et al.* 2013). Substitution nucleotide model was estimated in jModelTest v2.1.6 (Darriba *et al.*, 2012; Guindon & Gascuel 2003), available in CIPRES Science gateway (Miller *et al.*, 2010, <http://www.phylo.org/>), using bayesian information criterion (BIC). Phylogenetic analysis using the Bayesian inference was performed using MrBayes v3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) available in CIPRES Science gateway with 4 MCMC, 20 million

generations, a burn-in of 25%, and using a three partitioned model (ITS1, 5.8s, ITS2). The consensus tree was edited in FigTree v1.0.4. Posterior probabilities greater than 0.95 were considered significant. Maximum Likelihood analyses was performed under a GTRGAMMA model, using RAxML v 8.1.24 (Stamatakis, 2014) available in CIPRES science gateway. To access the reliability of the nodes, 1000 multi-parametric bootstrapping replicates were computed. Bootstrap values greater than 70 were considered significant. Outgroup were three Hydnodontaceae species: *Porpomyces mucidus*, *Fibrodontia alba* and *F. gossypina*.

**Table 1.** *Trechispora* specimens and ITS sequence data used in the phylogenetic analysis.

<b>Taxa</b>	<b>Voucher</b>	<b>Country</b>	<b>GenBank accession numbers</b>	<b>Source</b>
<i>Trechispora byssinella</i>	BE 135	Sweden	UDB024785	Basidiome
<i>T. cohaerens</i>	TU 115568	Estonia	UDB016421	Basidiome
<i>T. cohaerens</i>	TU 110332	Estonia	UDB008249	Basidiome
<i>T. cyatheae</i>	FR0219442	Reunion	UDB024014	Basidiome
<i>T. cyatheae</i>	FR0219443	Reunion	UDB024016	Basidiome
<i>T. echinocristallina</i>	FR0219445	Reunion	UDB024018	Basidiome
<i>T. echinocristallina</i>	TU 110414	Papua New Guinea	UDB013050	Basidiome
<i>T. hymenocystis</i>	TL 11112	Denmark	UDB000778	Basidiome
<i>T. hymenocystis</i>	TU 117137	Estonia	UDB024146	Basidiome
<i>T. invisitata</i>	RGC 30-9	Sweden	UDB024810	Basidiome

Cont.

Taxa	Voucher	Country	GenBank accession numbers	Source
<i>T. laevis</i>	TU 115551	Estonia	UDB016406	Basidiome
<i>T. stevensonii</i>	TU 115499	Estonia	UDB016467	Basidiome
<i>T. thelephora</i>	Vanegas-León 109	Brazil	KY769868	Basidiome
<i>T. thelephora</i>	1984a AMV	Colombia	KF937368	Basidiome
<i>T. thelephora</i>	1820 AMV	Colombia	KF937369	Basidiome
<i>Trechispora</i> sp.	TU 110068	Ecuador	UDB014099	Basidiome
<i>Trechispora</i> sp.	TU 110054	Ecuador	UDB014091	Basidiome
<i>Trechispora</i> sp.	TU 110037	Ecuador	UDB014080	Basidiome
<i>Trechispora</i> sp.	TU110042	Ecuador	UDB014082	Basidiome
<i>Trechispora</i> sp.	TU 108305	Gabon	UDB016782	Basidiome
<i>Trechispora</i> sp.	R15	Brazil	KY769820	EcM
<i>Trechispora</i> sp.	R23	Brazil	KY769827	EcM
<i>Trechispora</i> sp.	Sulz 345	Brazil	LT594980	Sclerotium
<i>Trechispora</i> sp.	Sulz 346	Brazil	LT594981	Sclerotium
Fungi	SD-120.2	USA	DQ365644	EcM
Hydnodontaceae	R3	Brazil	KY769812	EcM
<i>Porpomyces mucidus</i>	TU 109467	Estonia	UDB024361	Basidiome
<i>Fibrodontia alba</i>	TNM F24944	Taiwan	KC928274	Basidiome
<i>Fibrodontia gossypina</i>	GEL 5042	Reunion	DQ249274	Basidiome

## Results

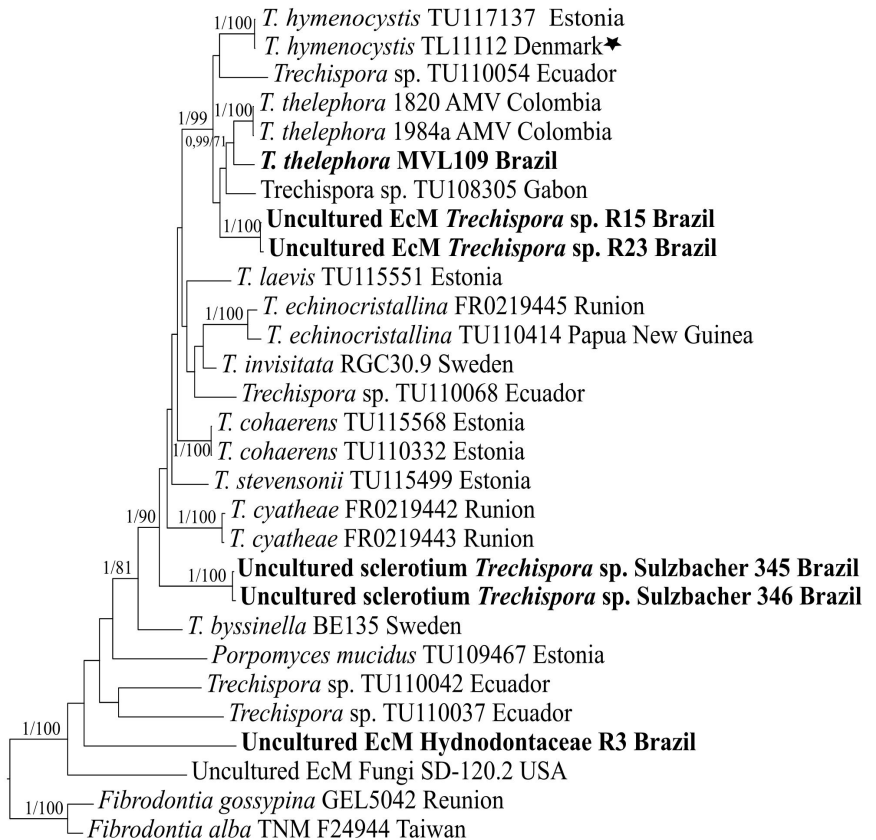
### *Molecular analyzes*

One hundred soil samples were collected of which 48 morphotypes had features of EcM fungi and 23 morphotypes were successfully sequenced. Seven were identified as Ascomycota and 16 as Basidiomycota. Phylogenetic studies of Hydnodontaceae showed two sequences fall within *Trechispora* and one sequence fall within Hydnodontaceae but was not possible to identify at genus level. *Trechispora* morphotypes were found only in spring (September-October) in both localities.

Bayesian inference (Figure 1) and maximum likelihood topologies (appendix I) showed that three Brazilian sequences fall in a monophyletic group. R15 is sister to R23 (pp=1/bs=100). The basidiome specimen MVL 109 is related to two Colombian specimens of *T. thelephora* (Lev) Ryvarden (pp=0,99/bs=71). R15, R23 and MVL 109 are more distantly related to *T. hymenocystis* (TL 11112 is a reference sequence SH016845.07FU for *T. hymenocystis*). Sclerotium sequences are related and are sister to other *Trechispora* species. Morphotype R3 is part of Hydnodontaceae, but relations with other species are uncertain.

The root tip morphotypes are different from each other, but all are characterized by a thin layer of mycelium on the surface. However, the typical features of a mantle were not observed and it is possible that *Trechispora* does not form a typical EcM tip due to the lack of a typical mantle. In cross section it was possible to observe septate hyphae on the root cortex (Figure 2), what confirms the ectomycorrhizal association.





007

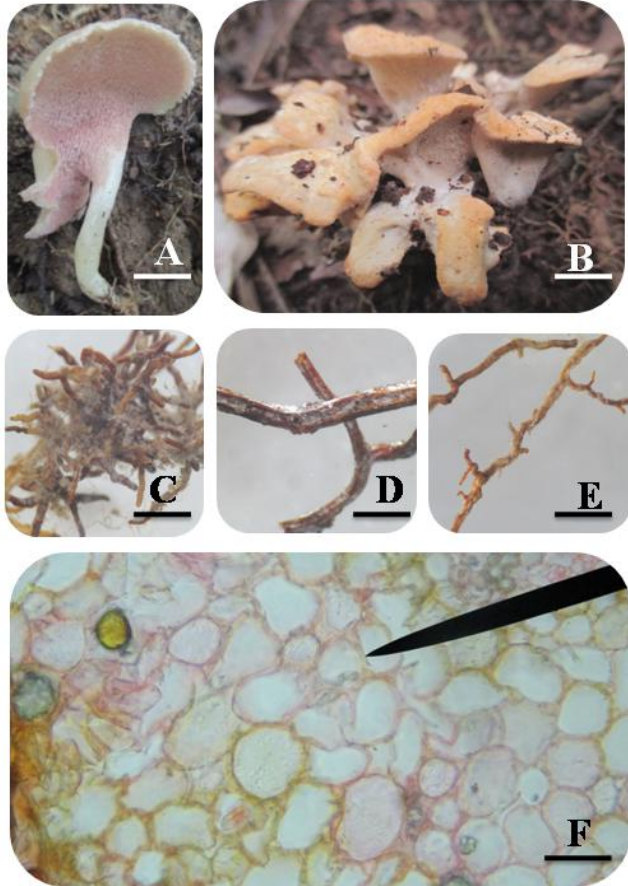
**Figure 1:** Bayesian inference tree showing phylogenetic relationships between EcM *Trechispora* and other species in the Hydnodontaceae family. Brazilian sequences in Bold. \*Reference sequence

### *Trechispora thelephora* morphological description

The specimens Vanegas-León, M.L. 109 (FLOR 61447) and Vanegas-León, M.L. 113 (FLOR 61448) (not included in molecular analyzes) were collected in Morro da Lagoa. The specimens were identified as *T. thelephora* (Rivarden, 2002). Basidiomes pileate-stipitate, upper surface light yellow brown, glabrous. Context thin pallid and not changing color when cut. Hymenophore hydroid pinkish, teeth 1.0–0.5 mm in length, running part way down the stipe. Stipe glabrous, concolorous with the upper surface of the basidiome. Hyphal system monomitic, generative subhymenial hyphae with thin walls and clamped. Basidia clavate, with four sterigmata  $14\text{--}26 \times 5\text{--}7 \mu\text{m}$ . Basidiospores ellipsoid, echinulate,  $4.0\text{--}5.0 \times 3.4\text{--}4.5 \mu\text{m}$  inamiloid. The current Brazilian distribution of *T. thelephora* is northern, northeast, southeast and southern regions, in the states of Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Pará, São Paulo, Paraná and Rio Grande do Sul (Flora do Brazil, 2017). *Trechispora thelephora* is registered for the first time for Santa Catarina.

### **Discussion**

Our phylogenetic analysis and observations morphological confirmed that R15 and R23 ectomycorrhizal root morphotypes belong to the genus *Trechispora*. Dunham *et al.* (2007) found an ectomycorrhizal root morphotype identified as *T. cf. stellulata* and discussed the possibility of some *Trechispora* species belong to an EcM lineage because they present features such as basidiomes growing in soil, rhizomorphs present, and difficulty in germinating spores on common malt agar. In this article we report new phylogenetic and morphological evidences about *Trechispora* being an ectomycorrhizal taxon.



**Figure 2:** A: MVL 109 *Trechispora thelephora* basidiome. B: MVL113 *T. thelephora* basidiome. C: EcM root tip R3. D: EcM root tip R23. E: EcM root tip R15. F: R23cross section with hyphae (arrow). Scale bar: A, B: 2 cm. C, D, E: 2 mm. F: 20  $\mu$ m

Phylogenetic analysis shows that the samples from where belong to *Trechispora*. However, we could not identify the collected specimens to

the species level because existing molecular databases have few reference sequences for neotropical fungi and the sequences analyzed in this study are mainly from European materials. Future research must be done to identify *Trechispora* associated species and to investigate which are the plants associated with EcM fungi in the Atlantic Forest. According to what is known about neotropical EcM plants, members of Polygonaceae and Nyctaginaceae have high probabilities to form associations with fungi in Santa Catarina Island ( Henkel *et al.*, 2002; 2012; Haug *et al.*, 2005; Smith & Read, 2008; Tedersoo *et al.*, 2010b).

Recent phylogenetic studies have revealed that ectomycorrhizal associations occur in 78–82 lineages of Dikarya (Tedersoo & Smith, 2013). In addition, rare groups of EcM fungi may remain to be discovered (Tedersoo & Smith, 2013). We believe that some species of *Trechispora* are rare ectomycorrhizal lineage because the number of root tips collected was low. *Trechispora* root tips had a poorly developed mantle compared to typical EcM mantles from boreal and north temperate regions (Agerer, 1997; Smith & Read, 2008), what makes it difficult to recognize morphologically it. Also, it is possible that *Trechispora* ectomycorrhizal species are restricted to the neotropics or more specifically to the Brazilian Atlantic forest.

Further studies should focus on identifying the plants that are involved in this symbiosis with *Trechispora*, as well as trying to better understand the morphology of the root tip. This study helps to elucidate the mode of nutrition of some fungal taxa. Also, it contributes to increase the knowledge about ectomycorrhizal fungi and the interactions of fungi

and plants in the Atlantic forest. This type of forest is a diversity hot spot and is strongly threatened by the loss and habitat fragmentation.

## References

Abarenkov, K., Tedersoo, L., Nilsson, R. H., Vellak, K., Saar, I., Veldre, V., & Kurina, O. (2010). PlutoF—a web based workbench for ecological and taxonomic research, with an online implementation for fungal ITS sequences. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 6, 189.

Agerer, R. (1997). *Colour atlas of ectomycorrhizae*. Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger GmbH.

Alvarez-Manjarrez, J., Villegas-Ríos, M., Garibay-Orijel, R., Contreras-Pacheco, M., & Kõljalg, U. (2016). *Tomentella brunneoincrustata*, the first described species of the *Pisonieae*-associated Neotropical *Tomentella* clade, and phylogenetic analysis of the genus in Mexico. *Mycological Progress*, 15(1), 1-11.

Andrade, A. C. S., Queiroz, M. H., Hermes, R. A. L., & Oliveira, V. L. (2000). Mycorrhizal status of some plants of the *Araucaria* forest and the Atlantic rainforest in Santa Catarina, Brazil. *Mycorrhiza*, 10(3), 131-136.

Buée, M., De Boer, W., Martin, F., Van Overbeek, L., & Jurkevitch, E. (2009). The rhizosphere zoo: an overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil*, 321(1-2), 189-212.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). *jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing*. *Nature methods*, 9(8), 772-772.

Doyle, JJ; Doyle, JL. (1987). A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemical Bulletin*: 19:11-15.

Dunham, S. M., Larsson, K. H., & Spatafora, J. W. (2007). Species richness and community composition of mat-forming ectomycorrhizal

fungi in old-and second-growth Douglas-fir forests of the HJ Andrews Experimental Forest, Oregon, USA. *Mycorrhiza*, 17(8), 633-645.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 28 Mar. 2017

Gardes, M., Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2), 113-118.

Giachini, A. J., Oliveira, V. L., Castellano, M. A., & Trappe, J. M. (2000). Ectomycorrhizal fungi in Eucalyptus and Pinus plantations in southern Brazil. *Mycologia*, 1166-1177.

Giachini, A. J., Souza, L. A., & Oliveira, V. L. (2004). Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of Eucalyptus dunnii and Pinus taeda in southern Brazil. *Mycorrhiza*, 14(6), 375-381.

Góes-Neto, A; Loguercio-Leite, C; Guerrero, Rt. (2005). DNA extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas*: 18(2): 19 – 32.

Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, 52(5), 696-704.

Halling, R. E. (2001). Ectomycorrhizae: co-evolution, significance, and biogeography. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 5-13.

Haug, I., Weiß, M., Homeier, J., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2005). Russulaceae and Thelephoraceae form ectomycorrhizas with members of the Nyctaginaceae (Caryophyllales) in the tropical mountain rain forest of southern Ecuador. *New Phytologist*, 165(3), 923-936.

Heijden, M. G., Martin, F. M., Selosse, M. A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205(4), 1406-1423.

Henkel, T. W., Aime, M. C., Chin, M. M., Miller, S. L., Vilgalys, R., & Smith, M. E. (2012). Ectomycorrhizal fungal sporocarp diversity and discovery of new taxa in Dicymbe monodominant forests of the Guiana Shield. *Biodiversity and Conservation*, 21(9), 2195-2220.

Hibbett, D. S., Ohman, A., Glotzer, D., Nuhn, M., Kirk, P., & Nilsson, R. H. (2011). Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews*, 25(1), 38-47.

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (2008). *Dictionary of the Fungi*.

Larsson, K. H. (1994). Poroid species in *Trechispora* and the use of calcium oxalate crystals for species identification. *Mycological Research*, 98(10), 1153-1172.

Larsson, K. H. (1996). New species and combinations in *Trechispora* (Corticaceae, Basidiomycotina). *Nordic Journal of Botany*, 16(1), 83-98.

Liberta, A. E. (1973). The genus *Trechispora* (Basidiomycetes, Corticiaceae). *Canadian Journal of Botany*, 51(10), 1871-1892.

Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 2010* (pp. 1-8). IEEE.

Moyersoen, B. (2006). Pakaraimaea dipterocarpacea is ectomycorrhizal, indicating an ancient Gondwanaland origin for the ectomycorrhizal habit in Dipterocarpaceae. *New Phytologist*, 172(4), 753-762.

Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574.

Roy, M., Schimann, H., Braga-Neto, R., Da Silva, R. A., Duque, J., Frame, D., Wartchow, F. & Neves, M. A. (2016). Diversity and Distribution of Ectomycorrhizal Fungi from Amazonian Lowland White-sand Forests in Brazil and French Guiana. *Biotropica*, 48(1), 90-100.

Ryvarden, L. (2002). A note on the genus *Hydnodon*. *Synopsis Fungorum*. 15:31-33

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... & Miller, A. N. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.

Smith, S. E., & Read, D. J. (1996). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.

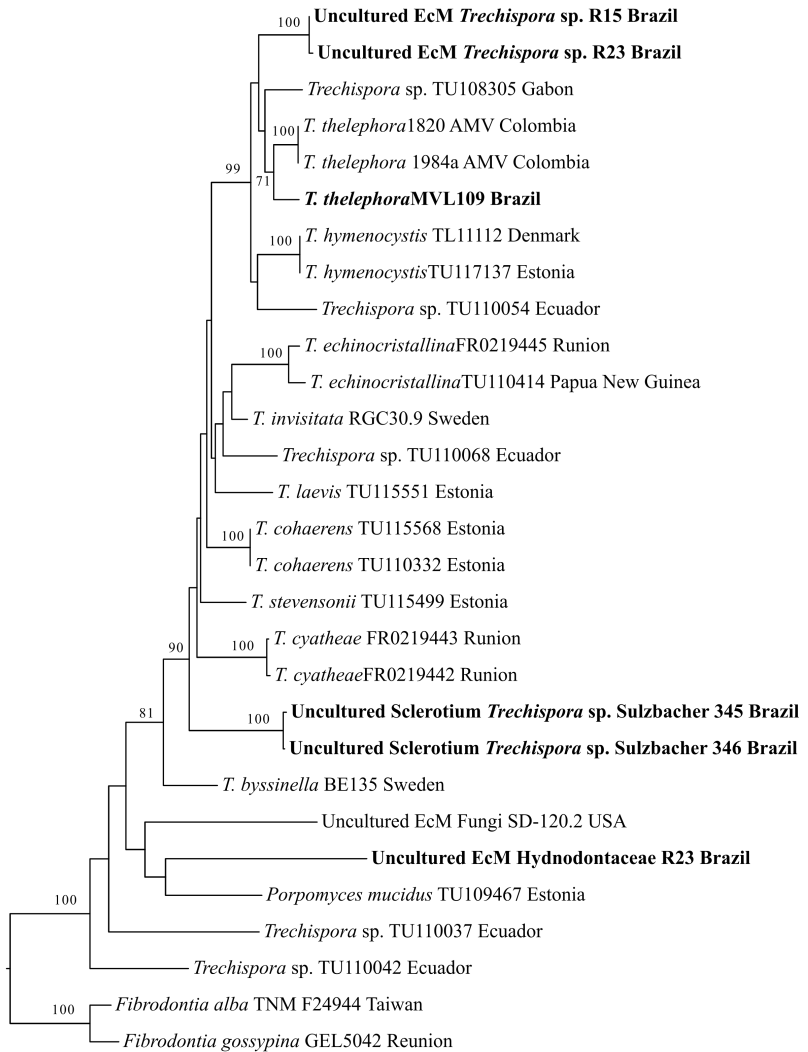
Smith, M. E., Henkel, T. W., Uehling, J. K., Fremier, A. K., Clarke, H. D., & Vilgalys, R. (2013). The ectomycorrhizal fungal community in a Neotropical forest dominated by the endemic dipterocarp *Pakaraimaea dipterocarpacea*. *PLoS one*, 8(1), e55160.

Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21), 2688-2690.

Suur, L. (2013). *Phylogeny and mycorrhizal associations of Nyctaginaceae* (Doctoral dissertation, Tartu Ülikool).



- Suvi, T., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Beaver, K., Gerlach, J., & Koljalg, U. (2010). Mycorrhizal symbionts of *Pisonia grandis* and *P. sechellarum* in Seychelles: identification of mycorrhizal fungi and description of new *Tomentella* species. *Mycologia*, 102(3), 522-533. ISO 690
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Tedersoo, L., May, T. W., & Smith, M. E. (2010a). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20(4), 217-263.
- Tedersoo, L., Sadam, A., Zambrano, M., Valencia, R., & Bahram, M. (2010b). Low diversity and high host preference of ectomycorrhizal fungi in Western Amazonia, a neotropical biodiversity hotspot. *The ISME journal*, 4(4), 465-471.
- Tedersoo L, Smith ME (2013) Lineages of ectomycorrhizal fungirevisited: foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biol Rev* 27:83–99.
- Wang, B., & Qiu, Y. L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16(5), 299-363.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Woehl Jr, G., Nishimura, W. E., Kamchen, S. (2008). *Mata Atlântica: essencial para a vida*. Instituto Rã-bugio para Conservação da Biodiversidade. Cartilha. ISBN 978-85-61891-02-2.
- Yokomizo, N.K.S. (1986). *Micorrizas em essenciais florestas*. Anais da I reunião brasileira sobre micorrizas. Lavras, Brasil: UFLA, p. 112.



**Appendix I:** Maximum likelihood topology showing phylogenetic relationships between EcM *Trechispora* and other species in the Hydnodontaceae family. Brazilian sequences in bold. \*Reference sequence

## Considerações finais

Na ilha de Santa Catarina existem registros de três gêneros de plantas que são reportadas como ectomicorrízicas em outras regiões do planeta: *Guapira*, *Neea* (Nyctaginaceae) e *Coccoloba* (Polygonaceae). *Guapira opposita* é muito abundante na ilha, enquanto que espécies de *Neea* e *Coccoloba* são pouco frequentes. Por essa razão, o esforço de amostragem deste trabalho foi focado em solo e raízes perto de *Guapira*. Todavia, devido à alta diversidade da Mata Atlântica, se esperava encontrar raízes micorrizadas de outros grupos. Só foi possível identificar, através de identificação molecular (*barcoding*), seis amostras de plantas ao nível de família. Foi confirmada a família Nyctaginaceae e além dela foram encontradas outras cinco famílias. A família Myrtaceae, que é conhecida por ter algumas espécies ectomicorrízicas e outras formadoras de MA. Na família Sapindaceae são descritas associações com os gêneros *Allophylus* e *Nephelium* e as famílias Anacardiaceae, Lauraceae, Moraceae também foram encontradas, mas as espécies que pertencem a estas famílias nunca foram registradas como ectomicorrizas (Smith & Read, 2008).

Os resultados dos simbiontes não foram ótimos devido a problemas na amplificação do fragmento de DNA desejado. Foram testados primers para a amplificação dos marcadores *matk*, *rbcl* e íntron de *trnL*. Para o marcador *matk* foram testadas várias temperaturas e concentrações mas não obtivemos sucesso. Com o marcador íntron de *trnL* foram amplificadas bandas duplas e o protocolo de purificação de bandas duplas com fenol foi testado mas o DNA desnaturou. O marcador *rbcl* amplificou seis de 23 amostras de raiz; foram testadas 10 amostras de

folha e todas amplificaram com sucesso. Portanto eu acredito que a baixa taxa de ampliações têm a ver com a baixa quantidade de plastídios nas raízes, ao contrário das folhas.

Espécimes dos gêneros *Amanita*, *Cantharellus*, *Clavulina*, *Entoloma* e *Ramaria* foram coletados ao longo da pesquisa, porém nenhuma das raízes coletadas está relacionada filogeneticamente com esses gêneros. Espécies destes fungos pertencem a linhagens definidas como ectomicorrízicos e por isso é possível que estejam associados com raízes que não foram coletadas. São necessárias amostragens mais aprofundadas para estabelecer quais são as plantas que estão se associando com estes fungos na Mata Atlântica.

Os fungos mais frequentes nas raízes pertencem à família Russulaceae, uma linhagem tradicionalmente conhecida como ectomicorrízica, amplamente distribuída e associada com diversas linhagens de plantas. Esta pesquisa permitiu demonstrar que Russulaceae está presente nas raízes das plantas da Mata Atlântica. Também foi possível observar a variação morfológica que as ectomicorrizas da região neotropical possuem com relação às micorrizas tradicionais das regiões boreais e temperadas. Embora não tenha sido possível estabelecer todos os simbiontes, confirmou-se Nyctaginaceae e Moraceae. Moraceae merece estudos futuros para estabelecer se realmente forma ectomicorrizas ou não.

Por outro lado foi encontrado nas raízes o gênero *Trechispora*. Este gênero foi encontrado nas raízes num estudo feito nos Estados Unidos e acredita-se que algumas espécies podem ter associações com as plantas. Nesta pesquisa o gênero foi achado nas raízes, mas não é frequente. Nas

análises morfológicas foram observadas algumas hifas septadas no córtex da raiz porém não foi visto manto. Infelizmente não foi possível estabelecer os simbiontes para os registros de *Trechispora*. Também foi registrada pela primeira vez a espécie *T. thelephora* para o estado de Santa Catarina. É importante aprofundar esta pesquisa a fim de descrever morfológicamente o tipo de associação, encontrar as plantas com as quais *Trechispora* está associada, além de identificar quais são as espécies micorrízicas de *Trechispora*.

Outro resultado interessante foi a alta frequência de fungos do filo Ascomycota nas raízes (sete de 23 amostras). Por questões de tempo não foi possível estabelecer se estas amostras pertencem a uma linhagem ectomicorrízica ou não e as análises realizadas utilizaram apenas o Blastn na plataforma UNITE. As famílias Anacardiaceae e Lauraceae foram identificadas como possíveis simbiontes de Ascomycota. Foram descritas aproximadamente 30 linhagens de Ascomycota que fazem associações ectomicorrízicas (Tedersoo & Smith 2013) e nenhuma das amostras coletadas coincidem com as associações conhecidas. Estudos mais aprofundados são necessários a fim de conferir se há linhagens ectomicorrízicas novas do filo Ascomycota para a Mata Atlântica e quais são os simbiontes.

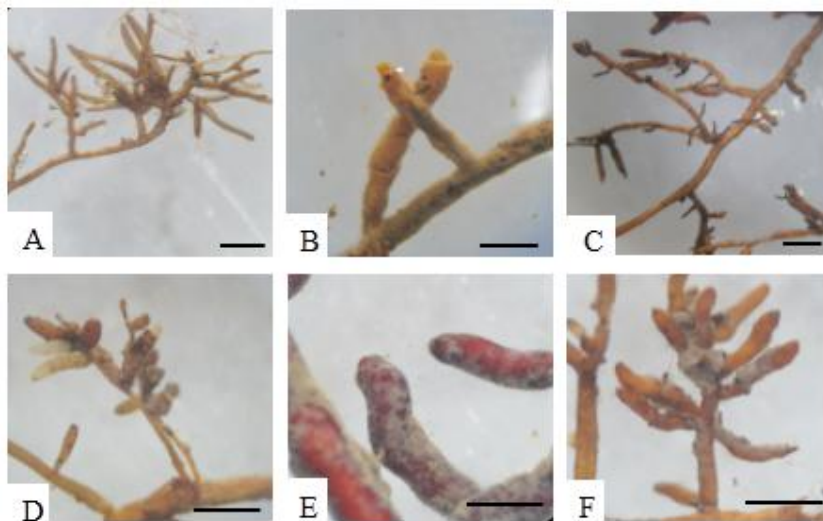
Alguns fungos encontrados nas raízes pertencem a Agaricaceae, Clavariaceae, Entolomataceae (*Entoloma s.l.*) Marasmiaceae, Mycenaceae, e Xylariaceae, linhagens consideradas como saprófitas. É possível que estes fungos estejam decompondo as raízes ou que realmente exista uma associação simbiótica entre estes fungos e as

plantas. É necessário fazer cortes anatômicos das amostras e observar se há rede de Hartig e manto para confirmar a associação.

A morfologia das raízes micorrizadas encontradas é muito diferente das micorrizas descritas na literatura disponível. Não foram observados mantos conspícuos e nos cortes feitos o material fresco não foi possível distinguir rede de Hartig. Foi muito difícil para mim diferenciar entre um bom morfotipo ectomicorrízico e uma raiz não micorrizada, na morfologia externa e nos cortes do material, por isso foi decidido focar nas análises moleculares. Finalmente eu escolhi os morfotipos que tinham mais modificações nas raízes terciárias ou algum tipo de hifas cobrindo a raiz. Para próximas pesquisas eu acho muito importante fazer cortes e conferir a associação. Uma opção para ter certeza que a sequência pertence ao fungo que esta associado à raiz é dividir longitudinalmente a amostra em duas partes e usar uma parte para as análises moleculares e conservar a outra metade para as análises morfológicas, como feito por Yamamoto *et al.* (2016). Neste trabalho eles apresentam pela primeira vez a linhagem /Endogone associada com *Quercus acutissima* e *Q. crispula* no Japão

Quarenta e oito morfotipos foram selecionados para as análises moleculares e só 23 amostras foram amplificadas, sempre com kit de extração (com o protocolo de CTAB nenhuma amostra foi amplificada com sucesso). A análise das sequências foi laboriosa devido à baixa quantidade de sequências neotropicais nos bancos de dados. As sequências no filo Basidiomycota foram analisadas filogeneticamente, mas as sequências do filo Ascomycota não foram relacionadas a gêneros ou famílias. Vinte e cinco morfotipos possivelmente ectomicorrízicos

não foram sequenciados com sucesso, alguns deles possuíam modificações nas raízes terciárias, ápices ou micélio associado, futuras pesquisas poderiam coletar de novo estes morfotipos, identificar-os e saber se são ectomicorrízicos ou não (Figura 3).



**Figura 3:** Morfotipos ectomicorrízicos não identificados A: EcM morfotipo R19. B: EcM morfotipo R28. C: EcM morfotipo R37. D: EcM morfotipo R38. E: EcM morfotipo R40 F: EcM morfotipo R46. Escalas: 2 mm.

A identificação dos basidiomas foi feita até gênero por meio de características diagnosticas devido ao pouco tempo de pesquisa e o foco do trabalho. Mas também porque muitas das espécies coletadas na Mata Atlântica e em geral muitas das espécies dos neotropicos ainda precisam ser descritas. Alguns grupos como Boletales ou Russulaceae estão sendo trabalhados por colegas sistemáticos, mas outros grupos ainda não foram examinados.

Pesquisas futuras devem ser feitas a fim de estabelecer quais são os fungos ectomicorrízicos e quais são as plantas associadas. Outros projetos podem focar em tentar explicar por quê as ectomicorrizas da região têm a morfologia diferente e talvez em alguns anos seja possível fazer pesquisas em biogeografia dos fungos ectomicorrízicos da Mata Atlântica.

## **Referências**

Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). Mycorrhizal symbiosis. Academic press.

Tedersoo, L., & Smith, M. E. (2013). Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal biology reviews*, 27(3), 83-99.

Yamamoto, K., Endo, N., Degawa, Y., Fukuda, M., & Yamada, A. (2016). First detection of *Endogone* ectomycorrhizas in natural oak forests. *Mycorrhiza*, 1-7.



# Apêndice I

## Linhagens de Fungos ectomicorrízicos (Tedersoo *et al.*, 2010)

### **Basidiomycota**

#### **Agaricales**

/agaricales1

/amanita

/catathelasma

/cortinariu

/descolea

/entoloma

/hebeloma-alnicola

/hygrophorus

/inocybe

/laccaria

/paralyophyllum

/tricholoma

#### **Atheliales**

/amphinema-tylospora

/atheliales1

/atheliales2

/byssocorticium

/piloderma

73

### **Boletales**

/austropaxillus

/boletus

/paxillus-gyrodon

/pisolithus-scleroderma

/suillus-rhizopogon

### **Cantharelalles s.l.**

/cantharellus

/clavulina

/tulasnella1

/tulasnella2

/ceratobasidium1

/ceratobasidium2

### **Gomphales**

/clavariadelphus

/ramaria-gautieria

### **Hymenochaetales**

/coltricia: Coltricia Coltriciella

## **Hysteraginales**

/hysterangium

## **Russulales**

/albatrellus

/russula-lactarius

## **Sebacinales**

/sebacina

/serendipita1

/serendipita2

## **Thelephorales**

/boletopsis

/hydnum-sarcodon

/phellodon-bankera

/pseudotomentella

/tomentella-thelephora

/tomentellopsis

## **Basidiomycota *incertae sedis***

/agaricomycetes1

## **Zygomycota**

### **Endogonales**

/endogone1

/endogone2

/densospora

## **Ascomycota**

### **Dothideomycetes *incertae sedis***

/cenococcum

### **Eurotiales**

/elaphomyces

### **Helotiales**

/acephala macrosclerotiorum

/meliniomyces

/helotiales1

/helotiales2

/helotiales3

/helotiales4

/helotiales5

/helotiales6

<b>Pezizales</b>	/pyronemataceae2
/aleurina	/rhodoscypha
/galactinia	/sarcosphaera-hydnotryopsis
/genea-humaria	/sphaerosporella
/geopora	/tarzetta
/hydnotrya	/terfezia-peziza
/leucangium	/tuber-helvella
/marcelleina-peziza gerardii	/wilcoxina
/otidea	
/pachyphloeus-amylascus	<b>Sordariales</b>
/pulvinula	/sordariales1
/pustularia	/sordariales2
/pyronemataceae1	

## Apêndice II

### Protocolo de extração de DNA

1. Macerar um fragmento do basidioma com nitrogênio líquido
2. Adicionar 800 µl de tampão CTAB quente (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; CTAB 2%; PVP 2%) e 4 µl de β-mercaptoetanol
3. Fazer choque térmico
  - 5' banho-Maria
  - 5' freezer
  - 5' banho-Maria
  - 5' freezer
  - 15' banho-Maria

4. Centrifugar 5' 13.000 rpm, recuperar sobrenadante e colocar em tubo novo
5. Adicionar 800 µl de Clorofórmio-Álcool isoamílico na proporção 24:1
6. Deixar em agitação por 15''
7. Centrifugar 10' a 14.000 rpm
8. Retirar o sobrenadante e acondicionar em tubo de 1,5 ml e adicionar 800 µl de isopropanol gelado (vão se formar três fases, pegar a última)
9. Deixar as amostras no freezer por 2 horas no mínimo
10. Centrifugar 7' a 13.000 rpm  
Congelar 5' no freezer  
Centrifugar 7' 13.000 rpm
11. Descartar sobrenadante
12. Adicionar 700 µl de etanol 100%; homogeneizar no vortex; colocar 5' no freezer e depois centrifugar 10' a 13.000 rpm
13. Adicionar 700 µl de etanol 80%; homogeneizar no vortex; colocar 5' no freezer e depois centrifugar 10' a 13.000 rpm
14. Adicionar 700 µl de etanol 70%; homogeneizar no vortex; colocar 5' no freezer e depois centrifugar 10' a 13.000 rpm (Se as amostras estão sujas lavar de novo)
15. Deixar secar a temperatura ambiente ou em banho-seco no máximo em 40°C
16. Adicionar 50 µl de tampão TE (Tris HCl 50 mM pH 8,0 e EDTA 10 mM)
17. Deixar resuspendendo pelo menos 24 horas no mínimo

## Apêndice III

### Protocolo PCR ITS

### Condições termociclador (35 ciclos)

Primers ITS 1F e ITS 4	95°C - 5 min
1 µl de cada Primer	95°C - 30 s
13 µl de DNA (Diluição 1:10)	61°C - 30 s
15 µl de Pre mix	72°C - 1 min
Volume total: 30 µl	72°C - 5 min
	10°C - α

## Apêndice IV

### Protocolo de purificação

1. Adicionar igual volume do amplificado de polietilenoglicol PEG 20% e mixturar bem
2. Incubar em banho-maria a 37°C por 30'
3. Centrifugar 15' a 13.000 rpm
4. Retirar o máximo possível do sobrenadante com uma pipeta com cuidado para não encostar no fundo e nas paredes do tubo
5. Adicionar 125 µl de etanol 80% gelado e centrifugar por 5' a 13.000 rpm
6. Retirar o máximo possível de sobrenadante revertendo o tubo e secar a borda com papel absorvente
7. Repetir os passos 5 e 6
8. Deixar os tubos abertos para secar a temperatura ambiente ou em banho-seco a 45°C, até evaporar todo o etanol
9. Adicionar em 15µl H<sub>2</sub>O miliQ
10. Resuspender em banho-maria a 45°C por 30'

## **Apêndice V**

### **Protocolo PCR rbcl**

Primers rbcl 1F e rbcl 724R

0,5 µl de cada Primer

10 µl de Pre mix

10 µl de Água ultra pura

4 µl de DNA

Volume total: 25 µl

### **Condições termociclador (35 ciclos)**

95°C - 5 min

95°C - 1 min

48°C - 30 s

72°C - 1 min

72°C - 7 min

10°C - α