



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

Marivane Celmer Slodkowski

**Contribuições das ectomicorrizas sobre o metabolismo da *Guapira opposita* (Vell.) Reitz
(Nyctaginaceae Juss.), uma espécie-chave na sucessão da restinga**

Florianópolis

2020

Marivane Celmer Slodkowski

**Contribuições das ectomicorrizas sobre o metabolismo da *Guapira opposita* (Vell.) Reitz
(Nyctaginaceae Juss.), uma espécie-chave na sucessão da restinga**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de
mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas
Orientador: Prof. Paulo Tamasso Mioto, Dr.
Coorientadora: Prof. Maria Alice Neves, Dra.

Florianópolis

2020

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

Slodkowski, Marivane Celmer
Contribuições das ectomicorrizas sobre o metabolismo da
Guapira opposita (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae Juss.), uma
espécie-chave na sucessão da restinga / Marivane Celmer
Slodkowski ; orientador, Paulo Tamaso Mioto,
coorientadora, Maria Alice Neves, 2021.
64 p.

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

Inclui referências.

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

Marivane Celmer Slodkowski

**Contribuições das ectomicorrizas sobre o metabolismo da *Guapira opposita* (Vell.) Reitz
(Nyctaginaceae Juss.), uma espécie-chave na sucessão da restinga**

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

Prof. Paulo Tamaso Miotto, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Profª. Aída Marcela Vasco Palacios, Dra.

Universidade de Antioquia

Profª. Emanuela Wehmuth Alves Weidlich, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

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

Mayara Krasinski Caddah, Dra.

Coordenadora do Programa

Prof. Paulo Tamaso Miotto, Dr.

Orientador

Florianópolis

2020

À minha família, por todo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me conceder proteção, força, disposição e saúde, além de sempre colocar pessoas incríveis junto a mim.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de acesso ao ensino público, gratuito e de qualidade e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa concedida durante a execução deste trabalho (Mar. 2018 - Fev. 2020).

Também agradeço ao Departamento de Botânica e o PPGFAP por toda estrutura oferecida para a realização deste trabalho e todos os professores, técnicos, servidores e terceirizados, pelos ensinamentos e apoio transmitidos durante esses dois anos.

Aos Laboratórios de Fisiologia, Biotecnologia e Anatomia Vegetal e o Laboratório de Micologia (MICOLAB) por disponibilizarem o uso de suas infraestruturas para estudo, planejamento, desenvolvimento e análise dos experimentos.

À Fundação Municipal de Meio Ambiente de Florianópolis - FLORAM, pela autorização da utilização do espaço do Monumento Natural Municipal da Lagoa do Peri para a execução dos experimentos, por estarem sempre à disposição em ajudar no desenvolvimento do experimento e também pela autorização da utilização do seu espaço para a realização dos diversos eventos e disciplinas que tive o prazer de participar ao longo desses dois anos juntamente com o MICOLAB e PPGFAP.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Paulo Tamaso Miotto, pela oportunidade de ser sua primeira orientanda de mestrado, aceitando embarcar nesse desafio, pela disposição em ensinar e ajudar em tudo que fosse possível, além de todo apoio, amizade e atenção para com todos seus alunos. E à Prof^a. Dra. Maria Alice Neves, que me abriu as portas para os fungos e me apresentou esse incrível mundo das ectomicorrizas, agradeço por todo amparo, carinho e amizade de sempre, além de ser um grande micélio de amor e inspiração que contagia a todos. Sou muito grata por ter duas pessoas tão incríveis como orientadores.

A todos micolabianos pela parceria ao longo desses anos, especialmente aos amigos que levo no coração. Essas pessoas fizeram com que tudo isso fosse mais leve e divertido, com bate-papos descontraídos, almoços coletivos, lanches, cafés, festinhas ou aquele bar no fim do dia.

À Duda, Carina e Ariadne, pela parceria na realização dos trabalhos, por me defenderem quando eu não pude e por todo apoio, amizade e os vários momentos de descontração ♥.

À Lara, João, Amanda, Will, Alejandra, Paulo e todos que de alguma forma me ajudaram no desenvolvimento dos experimentos. A Manu pela ajuda nas análises dos resultados e avaliações do projeto contribuindo para o enriquecimento desta dissertação. E a Indiani pela ajuda na elaboração dos mapas, dicas e todo apoio e amizade em tempos de pandemia ♥.

Aos colegas do Lab. de Fisiologia Vegetal pelas várias discussões de trabalhos e conversas que com certeza agregaram muito ao meu conhecimento. Aos colegas do lado (Anatomia vegetal), pelos momentos de descontração, desabafos e cafés. E aos demais colegas da Botânica por todo apoio e aprendizado.

À minha família, em especial aos meus pais Balbina e Mario, a minha irmã Marilene e meus sobrinhos Christian e Murilo, a quem eu dedico este trabalho. Agradeço por todo amor, carinho e apoio. Estar longe deles com certeza foi um dos maiores desafios. Um obrigada especial à minha mãe que é uma grande amiga e confidente, com quem passei várias horas ao telefone todas as noites, tornando a distância menos dolorida.

Ao Deivi, por todo incentivo, carinho e paciência. A todos amigos de perto ou de longe que sempre torcem por mim, especialmente, Dani, Adriano, Adriele e Lia, Fernanda, Tamara, Roxane e Salomão, também minhas primeiras mestras na graduação Nilvane e Núbia por me encorajarem a seguir na pesquisa e ao Prof. Dr. Jair Putzke que foi minha primeira inspiração e grande incentivador para o estudo dos fungos.

E um obrigado especial à Floripa como um todo, todas as pessoas e lugares que eu conheci nessa cidade contribuíram para que eu me tornasse mais humana, mais forte e posso dizer, mais empoderada. Posso afirmar que sou outra pessoa depois de conviver nesse lugar, que agora tem meu coração.

Enfim, deixo aqui meu muito obrigada a todos que de alguma forma contribuíram no processo de construção desta dissertação.

#respiraFunGo

“Uma floresta é muito mais do que podemos ver”
(Tradução livre - Suzanne Simard)

RESUMO

Ectomicorrizas são associações entre fungos e plantas, onde o fungo aumenta a zona de absorção de nutrientes e água para a planta e em troca recebe o carbono obtido pela planta através da fotossíntese. Além de aumentar a absorção de nutrientes, as ectomicorrizas podem formar redes de conexões e estabelecer uma via de comunicação entre plantas, através das redes miceliais comuns no solo, proporcionando a troca de nutrientes e sinais de defesas, favorecendo o crescimento e sobrevivência em diversos ambientes. A restinga é um dos ecossistemas da Mata Atlântica e está localizado ao longo da costa brasileira, formando uma zona de transição entre o mar e a mata mais densa. É caracterizada por apresentar condições como seca, alta salinidade e baixa disponibilidade de nutrientes. Por estas condições, a restinga é considerada um ambiente altamente desafiador para o estabelecimento de plantas e por isso acredita-se que a associação com fungos possa atenuar esses efeitos e proporcionar a colonização desses ambientes. Nas áreas de restinga do sul do Brasil, espécies como a *Guapira opposita* (Vell.) Reitz, exercem um papel de facilitadoras, auxiliando o estabelecimento de outras espécies de plantas. Estudos recentes vêm apontando uma forte importância dos micro-organismos do solo e suas associações como mediadores do processo de facilitação por plantas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi testar o potencial de ectomicorrização entre fungos e raízes de *G. opposita* e verificar os impactos dessa associação no crescimento da planta, tanto em condições de campo como em laboratório. Em um primeiro momento investigou-se a capacidade da microbiota do solo de restinga em favorecer o crescimento inicial da *G. opposita* e se seria possível detectar ectomicorrizas em suas raízes. Em um segundo momento, investigou-se o potencial das árvores adultas de *G. opposita* auxiliarem o crescimento de mudas da mesma espécie através da rede micelial comum das ectomicorrizas. Foi observado que a microbiota nativa do solo de restinga afetou o crescimento das plantas principalmente em relação à biomassa de parte aérea. Ainda foi possível observar que 75% das pontas das raízes em solo natural apresentaram ectomicorrizas. Não foram observadas diferenças significativas em relação à influência das redes de ectomicorrizas influenciarem o crescimento de mudas na restinga, porém estima-se que alguns parâmetros possam ter interferido na efetividade dos resultados. Conhecer a ecofisiologia e anatomia de *G. opposita* e suas associações ectomicorrízicas podem revelar informações importantes sobre a dinâmica das espécies de restinga, além de uma vasta possibilidade de aplicações desse conhecimento.

Palavras-chave: Simbioses. Redes micorrízicas. Micro-organismos do solo. Florestas subtropicais.

ABSTRACT

Ectomycorrhizae are symbiotic associations between fungi and plants, where the fungus increases the nutrient and water absorption for the plant and in exchange receives the carbon obtained by the plant through photosynthesis. In addition to increasing nutrient absorption, ectomycorrhizae can form networks and establish the exchange of signals and nutrients between plants through common mycelial networks in the soil, favoring growth and survival in various environments. The *restinga* is an Atlantic Forest ecosystem located along the Brazilian coast. It is characterized by adverse conditions such as drought, high salinity and low nutrient availability. For these reasons, it is considered a highly stressful environment for the establishment of plants and the association with fungi can possibly mitigate these effects. In the *restinga* areas of southern Brazil, species such as *Guapira opposita* play a facilitating role, helping the establishment of other species. Recent studies have indicated a strong importance of soil microorganisms and their associations, as mediators in the facilitation process by plants. The objective of this work was to test the potential for ectomycorrhization between fungi and roots of *G. opposita* and to verify the impacts of these associations on plant growth, both in field and laboratory conditions. At first, we investigated the ability of soil microorganisms in *restinga* to promote the initial growth of *G. opposita* and if it would be possible to detect ectomycorrhizae in their roots. In a second step, the potential of the adult trees of *G. opposita* to assist the growth of seedlings of the same species through the common mycelial network of ectomycorrhizae was investigated. It was observed that the soil microorganisms in the *restinga* affects plant growth especially related to shoot biomass. In addition, we found that about 75% of the root tips in natural soil had ectomycorrhizae. No significant differences were observed on the possibility of ectomycorrhizal networks to influence seedling growth in the *restinga*, but we estimated that some parameters may have interfered with the effectiveness of the results. Studies like this show the great potential of *restinga* plants and fungi to interact, but a lot more details on the ecophysiology and anatomy of *G. opposita* and its associations need to be clarified. These lines of investigation may reveal important information about the species dynamics in *restingas*.

Keywords: Symbioses. Ectomycorrhizal network. Soil microorganisms. Subtropical rainforest.

LISTA DE FIGURAS

Introdução:

- Figura 1 – Principais características de *G. opposita*. A- Aspecto geral da planta. B- Inflorescência. C- Frutos. D- Sementes. Escala = 1 cm 19
- Figura 2 – População de *G. opposita* com outras espécies sob sua copa 20

Capítulo 1:

- Figura 1 – Dias para a emergência de plântulas de *G. opposita* em solo natural de Restinga esterilizado ou não. Asteriscos indicam diferenças significativas entre tratamentos, segundo o teste T de Student ($p < 0,05$) 29
- Figura 2 – Avaliação trimestral do crescimento em altura e número de folhas de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo natural de Restinga esterilizado ou não. O ponto inicial para cada curva é a média de dias para germinação em cada tratamento. A- Altura das plantas (cm). B- Número de folhas. Letras indicam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$). 30
- Figura 3 – Avaliação final para altura e número de folhas de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo natural de Restinga esterilizado ou não. A- Altura das plantas (cm). B- Número de folhas. Asteriscos indicam diferenças significativas entre tratamentos, segundo o teste T de Student ($p < 0,05$) 31
- Figura 4 – Biomassa parte aérea (PA) de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo natural de Restinga esterilizado ou não. A- Biomassa fresca (MF). B- Biomassa seca (MS). Asteriscos indicam diferenças significativas entre tratamentos, segundo o teste T de Student ($p < 0,05$).. 31
- Figura 5 – Biomassa de raízes de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo natural de Restinga esterilizado ou não. A- Biomassa fresca (MF). B- Biomassa seca (MS) 31
- Figura 6 – Relação de biomassa seca de raiz para parte aérea (P.A.) de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo natural de Restinga esterilizado ou não. Asteriscos indicam diferenças significativas entre tratamentos, segundo o teste T de Student ($p < 0,05$) 32
- Figura 7 – Porcentagem de pontas de raízes apresentando ECM em plantas de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo natural de Restinga esterilizado ou não. 32
- Figura 8 – Morfologia de ectomicorrizas em raízes de *G. opposita* cultivadas por 8 meses em solo de Restinga. A-C - morfotipos; D- corte a mão livre, mostrando as estruturas da ECM.

ECM – ectomicorriza; RH – Rede de Hartig; MN – manto; ME – micélio extrarradicular.
Escala: C- 1 cm..... 33

Capítulo 2:

Figura 1 – Localização das unidades experimentais. A - Localização do MONA e do local do experimento (Em amarelo destaca-se o estado de Santa Catarina; marrom o município de Florianópolis e verde o MONA da Lagoa do Peri; Ponto amarelo indica o local do experimento); B - Disposição dos trios junto a uma população de *G. opposita*; C - Composição dos trios com uma muda de cada tratamento. 44

Figura 2 – Crescimento em altura de mudas de *G. opposita* após 8 meses submetidas ao cultivo em três tratamentos distintos. Preto – raízes em contato direto; Cinza – exclusão total e Branco – conexões hifais. 45

Figura 3 – Biomassa de parte aérea (caules e folhas) de mudas de *G. opposita* após 8 meses submetidas ao cultivo em três tratamentos distintos. A- Biomassa fresca. B- Biomassa seca. Preto – raízes em contato direto; Cinza – exclusão total e Branco – conexões hifais..... 46

Figura 4 – Razão de massa de raízes para parte aérea (caules e folhas) de mudas de *G. opposita* após 8 meses submetidas ao cultivo em três tratamentos distintos. Preto – raízes em contato direto; Cinza – exclusão total e Branco – conexões hifais 46

Figura 5 – Razão de massa de raízes para parte aérea (caules e folhas) de mudas de *G. opposita* após 8 meses submetidas ao cultivo em três tratamentos distintos. Preto – raízes em contato direto; Cinza – exclusão total e Branco – conexões hifais.. 46

Figura 6 – Taxa de ectomicorrização de pontas de raízes plantas de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo natural de Restinga esterilizado ou não. Preto – raízes em contato direto; Cinza – exclusão total e Branco – conexões hifais..... 47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	FUNGOS E ASSOCIAÇÕES MICORRÍZICAS	14
1.2	ECTOMICORRIZAS	15
1.3	ECTOMICORRIZAS TROPICAIS	16
1.4	RESTINGA E <i>GUAPIRA OPPOSITA</i>	18
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	CAPÍTULO 1 - Impacto da microbiota do solo nativo sobre o crescimento de <i>G. opposita</i>	23
4	CAPÍTULO 2 - Influência do acesso à rede micelial natural no crescimento de mudas de <i>G. opposita</i>	39
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
6	REFERÊNCIAS	54
7	APÊNDICES	59
7.1	APÊNDICE 1 – TESTES PARA CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>G. OPPOSITA</i> E FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS	60
7.2	APÊNDICE 2 - PROTOCOLO PARA CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>GUAPIRA OPPOSITA</i>	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 FUNGOS E ASSOCIAÇÕES MICORRÍZICAS

Os fungos são conhecidos por sua grande plasticidade, considerando seu habitat, hábito e modo nutricional. Esses organismos podem se associar com outros seres vivos e estabelecer relações mutualísticas (TEDERSOO et al., 2014). Entre essas relações estão as micorrizas, as quais são importantes associações simbióticas entre o micélio fúngico e raízes de plantas. Nessa relação, o fungo auxilia a planta na obtenção de água e nutrientes minerais, enquanto ela oferece aos fungos metabólitos primários provenientes da fotossíntese (SMITH; READ, 2008). Estima-se que as micorrizas surgiram há mais de 450 milhões de anos e que elas teriam sido indispensáveis para a evolução das comunidades de plantas e a ciclagem de nutrientes na escala dos biomas terrestres (LU; HEDIN, 2019; MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011).

Acredita-se que inicialmente os fungos foram atraídos para as plantas por meio de exsudados ricos em carbono e a partir disso eles desenvolveram mecanismos de penetração sem causar danos para as plantas. Uma das hipóteses é de que, primeiramente, os fungos interagiram com as plantas de forma endofítica, ou seja, o fungo vivendo dentro da planta sem causar danos ou alterações estruturais, associação que ocorre até hoje com muitas espécies, fazendo com que ao longo do tempo alguns fungos se tornassem dependentes das plantas (BRUNDRETT, 2002; SAIKKONEN et al., 1998), como por exemplo o nosso querido cacau (*Theobroma cacao* L.) que se associa a diversas espécies de fungos (RUBINI et al. 2005). As plantas, por sua vez, ainda não possuíam estruturas rizoides formadas e assim os fungos ofereceram um importante suporte para a absorção de nutrientes. Dessa forma, as plantas desenvolveram mecanismos para a identificação destes fungos benéficos e, com o desenvolvimento das raízes, uma camada de células se desenvolveu, produzindo uma interface difusa dentro da planta onde os fungos se tornaram mais permeáveis, proporcionando trocas de compostos, formando as micorrizas. Tudo isso acabou proporcionando um processo de coevolução, favorecendo as plantas na conquista do ambiente terrestre (BRUNDRETT, 2002). Ao longo do processo evolutivo essas associações foram se tornando mais específicas, de forma que atualmente são conhecidos quatro tipos principais de micorrizas: arbusculares (AM), orquidoides, ericoides e ectomicorrizas (ECMs). As principais diferenças entre elas incluem a forma pela qual o fungo se associa às raízes e os táxons envolvidos nesta relação (BRUNDRETT; TEDERSOO, 2018; VAN DER HEIJDEN et al., 2015).

Nesta dissertação trataremos com mais detalhes as associações ectomicorrízicas nos ambientes neotropicais e como elas podem afetar o desenvolvimento das plantas.

1.2 ECTOMICORRIZAS

A simbiose ectomicorrízica pode envolver mais de 6.000 espécies de fungos, principalmente do filo Basidiomycota, o qual inclui os principais gêneros de cogumelos como *Amanita* Pers., *Boletus* Tourn. e *Tricholoma* (Fr.) Staude. Estima-se que as espécies de plantas que realizam essas interações encontram-se distribuídas em 145 gêneros e 26 famílias, das quais cerca de 5.600 espécies pertencem ao grande grupo das Angiospermas, e cerca de 285 ao grupo das Gimnospermas (BRUNDRETT, 2009).

Morfologicamente, as ectomicorrizas (ECMs) são definidas por meio da presença de três componentes estruturais: um micélio extrarradicular; um manto envolvendo externamente a raiz; e a rede de Hartig, onde o micélio fúngico penetra nos espaços intercelulares do córtex da raiz para facilitar as trocas de compostos (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011; SMITH; READ, 2008). Embora a rede de Hartig esteja ligada com a troca de nutrientes, ela parece não ser essencial para que esse processo ocorra. Sa et al. (2019), mostraram que a inoculação do fungo ectomicorrízico *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. em um híbrido de Álamo Cinza (*Populus tremula* × *P. alba*) melhorava a nutrição das plantas, independente se a linhagem usada de *P. involutus* formava ou não a rede de Hartig. Vários trabalhos mostraram que as ECMs auxiliam a planta na absorção de diversos nutrientes minerais essenciais, principalmente o nitrogênio (N) e o fósforo (P) (BECQUER et al., 2014; CAIRNEY, 2011; SA et al., 2019; SIMARD et al., 1997; SMITH; ANDERSON; SMITH, 2015; WU et al., 2012). Grande parte desse auxílio acontece porque as hifas são geralmente mais estreitas do que as raízes das plantas, maximizando a superfície de contato com o solo e permitindo uma exploração mais completa de uma área (EKBLAD; WALLANDER; GODBOLD, 2013). Além disso, as ECMs parecem ser capazes de absorver fontes orgânicas de nitrogênio, como peptídeos e proteínas, e transferir os nutrientes à planta (WU, 2011). Isso é especialmente importante em ambientes com uma baixa taxa de mineralização da matéria orgânica e, conseqüentemente, baixa quantidade de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), as fontes de nitrogênio preferencialmente absorvidas pela maioria das plantas. Assim, o fungo é capaz de auxiliar a planta de diversas formas, recebendo em troca os carboidratos sintetizados através da fotossíntese. Mesmo assim, a importância fisiológica das ECMs para a planta pode ir além da absorção de água e nutrientes, desempenhando um importante papel na proteção contra fitopatógenos e compostos tóxicos,

além de possibilitar trocas de nutrientes entre diferentes indivíduos ou espécies vegetais (LUO et al., 2014; MCGUIRE, 2007; VAN DER HEIJDEN; HORTON, 2009).

Diversos experimentos mostraram que as trocas de nutrientes entre plantas podem ser especialmente importantes para a cooperação entre plantas adultas e jovens. Nesse contexto, Nara, (2006) e McGuire, (2007) demonstraram em experimentos tanto em laboratório quanto em campo (respectivamente), que existe uma colaboração por parte de plantas adultas no crescimento de mudas através das conexões hifais. No experimento desenvolvido por Nara (2006), foi possível observar que uma planta-mãe micorrízica (*Salix reinii* Pe. & Sav.), fornece o simbionte fúngico para mudas próximas através do sistema micelial. Para mostrar isso, mudas inoculadas com determinadas espécies de fungos foram cultivadas em solo esterilizado. Plantando sementes em torno da planta-mãe micorrízica foi possível observar que as plântulas cresceram melhor quando em contato com a rede micorrízica fornecida pela planta-mãe, isso pode ser observado com a maior parte das 12 espécies de fungos testadas. McGuire, (2007) demonstrou que plântulas de *Dicymbe corymbosa* Spruce ex. Benth, conectadas à rede micelial comum no solo tiveram uma maior sobrevivência e crescimento do que mudas excluídas do acesso à rede. Para isso, os pesquisadores usaram sacos de malha que permitiam ou não a conexão do micélio presente dentro do saco com a rede micorrízica do solo da floresta. Wu et al. (2012) mostraram que ectomicorrizas formadas por *Pisolithus* sp. em raízes de *Pinus thunbergii* Lamb., eram capazes de transferir fósforo e carbono entre as espécies vegetais através de conexões hifais, mas essas conexões só se formavam se as hifas fúngicas pertencessem ao fungo com a mesma carga genética. Esses resultados demonstram que pode ocorrer translocação de nutrientes por meio do sistema simbiótico, desde que os fungos sejam geneticamente próximos, implicando que existe algum mecanismo de reconhecimento entre os indivíduos fúngicos para promover as trocas, não ocorrendo ao acaso.

Em resumo, diversos resultados apontam que as ECMs podem auxiliar as plantas de diversas formas, permitindo que elas aproveitem melhor os recursos do local onde vivem ou que estejam protegidas de eventuais condições estressantes.

1.3 ECTOMICORRIZAS TROPICAIS

Enquanto em regiões temperadas do hemisfério norte as simbioses ectomicorrízicas já tenham sido muito estudadas, para as regiões tropicais as descobertas ainda são contestadas por diversos pesquisadores. Isso porque até pouco tempo acreditava-se que simbioses ectomicorrízicas em ambientes tropicais eram pouco prováveis (BÂ et al., 2012). Ao longo dos últimos anos diversas evidências vêm sendo acumuladas, porém, como os ambientes tropicais

costumam ser mega diversos e de difícil acesso, ainda existem grandes lacunas a serem exploradas e muita coisa a ser descoberta (SMITH et al., 2013). Na última década, estudos exploratórios vêm aumentando e evidenciando a existência de ectomicorrizas nesses ambientes (ALVAREZ-MANJARREZ; GARIBAY-ORIJEL; SMITH, 2018; CORRALES; HENKEL; SMITH, 2018; ROY et al., 2016; SMITH et al., 2011; VANEGAS-LEÓN et al., 2019). Atualmente, as famílias de plantas com maiores registros de associações ectomicorrízicas em regiões neotropicais são Fabaceae, Fagaceae, Nyctaginaceae, Pinaceae e Polygonaceae (CORRALES; HENKEL; SMITH, 2018).

No Brasil, os estudos iniciaram com levantamentos de espécies de fungos ectomicorrízicos. Singer; Araujo, (1979) Singer; Araujo; Ivory. (1983) realizaram os primeiros estudos de maior destaque, relatando a ocorrência de basidiomas ectomicorrízicos para a região amazônica. Atualmente já foram registradas 175 espécies de fungos potencialmente ECMs em áreas de floresta nativa (ROY et al., 2017).

Para a restinga, Sulzbacher et al. (2013) trouxeram informações em relação a ocorrência de basidiomas ectomicorrízicos. Representantes de famílias tradicionalmente descritas como ECMs foram registradas, dentre elas Amanitaceae, Boletaceae, Hymenochaetaceae, Russulaceae e Sclerodermataceae. Vanegas-León (2017), iniciou os estudos na ilha de Santa Catarina no sul do Brasil, trazendo diversos indícios de que as espécies vegetais ali ocorrentes realizam associações ectomicorrízicas. Um dos resultados, publicado recentemente, relatou esta simbiose pela primeira vez, envolvendo fungos do gênero *Trechispora* e tendo como prováveis simbiontes indivíduos da família Nyctaginaceae (VANEGAS-LEÓN et al., 2019). Nyctaginaceae é uma família frequentemente citada em estudos investigando associações ECMs nos ambientes tropicais (ALVAREZ-MANJARREZ et al., 2016; ALVAREZ-MANJARREZ; GARIBAY-ORIJEL; SMITH, 2018; HAUG et al., 2005; HAYWARD; HORTON, 2012). No Brasil há o registro de ocorrência para 48 espécies desta família (SÁ, 2015), o que torna essa uma família bastante interessante para investigações de associações ECMs. Neste caso, a representante mais abundante de Nyctaginaceae nos ambientes estudados por Vanegas-León et al. (2019) é a *Guapira opposita* (Vell.) Reitz, o que leva a crer que esta seria a espécie vegetal envolvida na simbiose estudada. Além dessa espécie, gêneros e famílias de plantas que nunca foram anteriormente registradas como tendo associação ECM foram registrados nas análises preliminares de Vanegas-León (2017), mas estes dados ainda precisam ser investigados mais a fundo.

A *G. opposita* é abundante na restinga do sul do Brasil (REITZ, 1970). Como esses ambientes possuem solo geralmente arenoso, salino, ácido e com tendências a lixiviação dos nutrientes e as ECMs proporcionam vantagens para lidar com esses desafios, acreditamos que esse possa ser um campo bastante fértil para buscar novas associações ectomicorrízicas (GOMES et al. 2007; MELO JUNIOR; BOERGER, 2014).

1.4 RESTINGA E *GUAPIRA OPPOSITA*

A restinga é um dos ecossistemas da Mata Atlântica característico da região litorânea do Brasil. A vegetação peculiar deste ambiente se adaptou às condições do solo arenoso, geralmente com alta salinidade e baixa concentração de nutrientes (FALKENBERG, 1999). Nas áreas de restinga da ilha de Santa Catarina, *G. opposita* é uma das espécies mais abundantes (Fig. 2).

Conhecida popularmente como maria-mole, *G. opposita* pertence à família Nyctaginaceae e possui ampla distribuição no Brasil, ocorrendo nos domínios da Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado. Seu porte pode variar entre árvore ou arbusto, com cuja altura pode variar entre 1 e 25 metros de altura (REITZ, 1970; SÁ, 2015). Em áreas de restinga ela assume um porte arbustivo, com folhas menores do que observado em florestas pluviais (Fig. 1A). Floresce de julho a janeiro e a frutificação ocorre entre novembro e fevereiro (REITZ, 1970), podendo se estender até abril (Fig. 1B e 1C). Os frutos são do tipo drupa ovalada, de cor vinácea quando maduros, com polpa suculenta, que servem de alimentação para os pássaros que também são os principais dispersores desta espécie (Fig. 1C e 1D) (LORENZI, 1998).



Figura 1- Principais características de *G. opposita*. Onde, A) Aspecto geral da planta. B) Inflorescência. C) Frutos. D) Sementes. Escala = 1 cm.

Fonte: Slodkowski, MC. 2018

Segundo Dalotto et al. (2018), esta espécie possui uma grande importância na formação da restinga, pois costuma formar núcleos de vegetação que incluem outras espécies lenhosas como *Clusia criuva* Cambess., *Myrcia palustris* DC. e *Ocotea pulchella* (Nees) Mez, além de bromélias das espécies *Vriesea friburgensis* Mez e *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. (Fig. 2). Estes núcleos variam de tamanho e atuam no recrutamento de várias espécies lenhosas de restinga sob sua copa e que não estão presentes com a mesma abundância em ambientes expostos ou sob a copa de outras lenhosas adultas (DALOTTO, 2016).



Figura 2- Núcleo de vegetação formado pela *G. opposita* e outras espécies sob sua copa.
Fonte: Slodkowski, MC. 2018

É fácil imaginar o potencial e a importância ecológica das ectomicorrizas nos ambientes tropicais, mas ainda há muita informação a ser descoberta. Por exemplo, os simbiontes fúngicos ainda são pouco conhecidos e sabe-se muito pouco a respeito da sua diversidade, fisiologia e quais seriam os fatores que influenciam os padrões de diversidade de fungos ECMs em diferentes comunidades de plantas (SMITH et al., 2011). Ainda, segundo MCGUIRÉ (2007), o papel ecológico dos fungos ectomicorrízicos, principalmente em ambientes tropicais, é pouco abordado, assim como a função que eles têm na diversidade de espécies nesses ambientes. Por isso, estudos sobre a diversidade, fisiologia e ecologia das ectomicorrizas para regiões tropicais têm se mostrado de fundamental importância para o conhecimento da biodiversidade ocorrente nestes locais.

Nesse contexto, esta dissertação visa contribuir no conhecimento a respeito das ectomicorrizas tropicais, trazendo uma abordagem ecofisiológica a respeito do comportamento da *G. opposita* perante esta simbiose. Para tanto, os trabalhos desenvolvidos estão descritos em

dois capítulos, com o primeiro abordando o impacto da microbiota do solo nativo de restinga sobre o crescimento de *G. opposita* e o segundo a influência do acesso à rede micelial natural no crescimento de mudas de *G. opposita*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Testar o potencial de ectomicorrização entre fungos e raízes de *Guapira opposita* e verificar os impactos dessa associação no crescimento da planta, tanto em condições de campo como em laboratório.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se *G. opposita* é capaz de formar associações ectomicorrízicas;
- Investigar como as ECMs afetam o crescimento da *G. opposita*;
- Verificar se a microbiota do solo é capaz de favorecer o crescimento de plantas de *G. opposita* em solo nativo de restinga;
- Verificar se mudas isoladas da rede micelial comum têm o crescimento prejudicado quando comparadas a plantas conectadas;

**3 CAPÍTULO 1 - IMPACTO DA MICROBIOTA DO SOLO NATIVO SOBRE O
CRESCIMENTO DE *GUAPIRA OPPOSITA* (VELL.) REITZ (NYCTAGINACEAE)**

Micro-organismos presentes no solo em ambientes de restinga melhoram o crescimento de *Guapira opposita* (vell.) Reitz (Nyctaginaceae Juss.), uma espécie-chave na sucessão da restinga

Marivane Celmer Slodkowski^{1*}, Maria Alice Neves¹, Paulo Tamaso Miotto¹.

¹*Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Botânica, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.*

*Autor para correspondência: marivane.slod@gmail.com

RESUMO

A composição dos ecossistemas em relação a comunidade vegetal é amplamente influenciada pelos micro-organismos presentes no solo. Isso pode ocorrer de diversas formas, sendo mais evidente em ambientes pobres em nutrientes. Os vários micro-organismos presentes no solo incluem principalmente bactérias e fungos e ambos podem interagir para modular a dinâmica da vegetação nos ecossistemas. No Brasil, acredita-se que a restinga seja um ambiente propício para a associação de plantas com microrganismos para promover melhor adaptação. Dentre os diversos tipos de relações que as plantas desenvolvem com os micro-organismos, acredita-se que as simbioses possam ser um ponto-chave na dinâmica dos ecossistemas. No caso dos fungos, as simbioses do tipo ectomicorrizas vêm ganhando maior destaque dentre as pesquisas em regiões tropicais. *Guapira opposita* (Vell.) Reitz é uma espécie vegetal, amplamente distribuída no Brasil, que pode exercer um importante papel de facilitação nos ecossistemas de restinga. Este estudo teve dois objetivos principais. O primeiro foi verificar se a microbiota do solo é capaz de favorecer o crescimento de plantas de *G. opposita* em solo natural de restinga e o segundo foi investigar se *G. opposita* é capaz de estabelecer associações ectomicorrízicas. Para tanto, foram estabelecidos dois tratamentos, utilizando solo natural de restinga esterilizado ou não. Observamos que plantas cultivadas em solo não esterilizado mostraram um aumento na biomassa da parte aérea, relacionada principalmente ao número de folhas. Também foi possível comprovar que a *G. opposita* consistentemente desenvolve associações ectomicorrízicas, com cerca de 75% das pontas de raízes de cada planta mostrando esse tipo de associação.

Palavras-chave: Simbioses, Fungos, Ectomicorrizas, Florestas tropicais.

INTRODUÇÃO

A composição da comunidade vegetal dos ecossistemas é fortemente influenciada pelos micro-organismos do solo (VAN DER HEIJDEN et al., 2006; VAN DER HEIJDEN; HORTON, 2009; GERZ et al., 2018). Essa influência pode ocorrer de diversas maneiras, como na ciclagem de nutrientes, associações simbióticas ou através de *feedbacks* da comunidade planta-solo, este último envolvendo os efeitos dos micro-organismos do solo para a planta (benéficos ou não), alterando a diversidade em um determinado local (BEVER et al., 2010; MOMMER; KIRKEGAARD; VAN RUIJVEN, 2016). Em ambientes pobres em nutrientes essa influência fica mais evidente, pois esses organismos podem auxiliar na captura e disponibilização de nutrientes, tolerância ao estresse e até mesmo oferecer proteção contra patógenos, herbívoros ou compostos tóxicos.

A restinga compõe uma série de ecossistemas costeiros, marcados justamente por um solo pobre, arenoso, com alta salinidade e forte tendência a lixiviação de nutrientes e que sofrem grande influência do mar (FALKENBERG, 1999; GOMES et al., 2007; MELO JÚNIOR; BOEGER, 2015). Esses ecossistemas são característicos da costa brasileira e ao longo de sua distribuição é possível observar uma ampla variação de ambientes, incluindo praias, dunas e planícies, cuja vegetação peculiar se adaptou a essas condições (FALKENBERG, 1999). Por estas características, acredita-se que a associação de plantas com microrganismos pode promover diversos benefícios nesse tipo de ambiente, como proteção contra estresses ou auxílio na captura de nutrientes.

Os vários microrganismos presentes no solo incluem principalmente bactérias e fungos e ambos podem interagir de diversas formas em relação a dinâmica da vegetação nos ecossistemas (VAN DER HEIJDEN; HORTON, 2009; VAN DER PUTTEN et al., 2013). Esses organismos podem influenciar o estabelecimento de plantas indiretamente, por meio da consolidação do solo, atuando nos processos de mineralização de nutrientes, alterando as interações com outras plantas e animais no caso de herbívoros e polinizadores ou até mesmo promovendo o antagonismo com outros micro-organismos patógenos; ou diretamente, estabelecendo simbioses e atuando como endófitos, rizóbios ou micorrízicos (BEVER et al., 2010; VAN DER PUTTEN et al., 2013; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA; LOZANO; BARDGETT, 2016). Diversos estudos vêm destacando a importância dessas relações principalmente no caso de plantas facilitadoras (RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA; LOZANO; BARDGETT, 2016).

Plantas facilitadoras são aquelas que possuem a capacidade de exercer um efeito positivo no estabelecimento de outras espécies em um determinado ambiente (BERTNESS; CALLAWAY, 1994). Além de possíveis interações que ocorrem acima do solo, as plantas facilitadoras podem atuar alterando a composição microbiana do solo de modo a favorecer a germinação, crescimento e sobrevivência de outras plantas (RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA et al., 2013; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA; LOZANO; BARDGETT, 2016). Dentro deste processo, no caso dos fungos, as simbioses micorrízicas podem ir além de simplesmente favorecer a sobrevivência de um único indivíduo, criando uma rede de comunicação subterrânea que pode possibilitar trocas de nutrientes, inclusive entre indivíduos de espécies diferentes e ajudar nos processos de resistência a perturbações, como patógenos ou predatórios, entre outros distúrbios (SIMARD et al., 1997, 2012; PEC et al., 2020). Frente a isso, é possível especular que o conjunto destes processos possibilita a formação de um ecossistema mais diversificado em ambientes como a restinga.

Dentre os vários tipos de micorrizas, as ectomicorrizas (ECMs) vêm ganhando maior ênfase em estudos para as regiões tropicais, onde por muito tempo acreditou-se que elas eram pouco prováveis. Alguns dos motivos para essas especulações são a alta diversidade vegetal e o solo rico em nutrientes na maioria das regiões (BÂ et al., 2012; CORRALES; HENKEL; SMITH, 2018). Contudo, nos últimos anos diversos estudos explorando as formações vegetais neotropicais vêm revelando uma diversidade desconhecida para esses ambientes e mostrando um alto potencial para novas descobertas, revelando até mesmo táxons de fungos que antes não eram classificados como micorrízicos (ROY et al., 2017; ALVAREZ-MANJARREZ; GARIBAY-ORIJEL; SMITH, 2018; SULZBACHER et al., 2019; VANEGAS-LEÓN et al., 2019). Um dos exemplos recentes é o estudo realizado por Vanegas-León et al. (2019) na Ilha de Santa Catarina no sul do Brasil, onde foi relatada pela primeira vez a associação ectomicorrízica ocorrendo com fungos do gênero *Trechispora*, tendo como prováveis simbiontes vegetais indivíduos da família Nyctaginaceae. Nesse caso, a representante mais abundante para esta família nos ambientes estudados é a *Guapira opposita*, o que levou a crer que esta espécie estaria envolvida nesta simbiose.

A *Guapira opposita* é conhecida popularmente como maria-mole, pertence à família Nyctaginaceae e possui ampla distribuição no Brasil. Ela é uma espécie abundante nas áreas de restinga, principalmente na região sul e nessas áreas assume um porte arbustivo, com folhas menores do que observado em florestas pluviais (REITZ, 1970). Essa espécie também pode assumir um importante papel na formação dos ecossistemas de restinga, já que, em muitos

casos, ela atua como facilitadora e favorece o estabelecimento de outras espécies sob a sua copa. Os núcleos formados ao redor das plantas de *G. opposita* podem variar de tamanho e atuam no recrutamento de várias espécies de restinga que não estão presentes com a mesma abundância em ambientes expostos ou sob a copa de outras lenhosas adultas (DALOTTO, 2016; DALOTTO et al., 2018). Neste contexto, é possível especular que parte da capacidade de nucleação de *G. opposita* seja consequência de um recrutamento da microbiota do solo. Dessa forma, este trabalho teve dois objetivos principais: o primeiro foi verificar se a microbiota do solo é capaz de favorecer o crescimento de plantas de *G. opposita* em solo natural de restinga e o segundo foi investigar se *G. opposita* é capaz de estabelecer associações ectomicorrízicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do estudo e amostragem

A amostragem de campo foi realizada no Monumento Natural da Lagoa do Peri, situado ao sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil. O Monumento Natural abrange uma área de 42,71km² compreendendo a bacia hidrográfica da Lagoa do Peri e envolve uma importante área de restinga da ilha (FLORAM).

A coleta de frutos foi realizada no mês de fevereiro de 2019, junto a uma população de *G. opposita*. Os frutos foram obtidos de diferentes indivíduos para garantir a variabilidade genética e foram mantidos por no máximo 15 dias em geladeira até o momento do plantio. Para o plantio, os frutos foram despulpados com ajuda de uma peneira e as sementes nuas foram esterilizadas em superfície com etanol 70% por dois minutos e hipoclorito de sódio 0,5% por 10 minutos, em seguida lavadas em água destilada esterilizada e semeadas em solo natural esterilizado e não esterilizado. Para maiores informações sobre protocolo de esterilização das sementes consultar apêndices.

Para a coleta do solo, cinco porções de solo natural de restinga foram coletadas sob o dossel da mesma população de *G. opposita*. Em laboratório o solo foi homogeneizado, peneirado para a retirada de raízes e serapilheira e dividido em duas porções, sendo que uma foi usada em seu estado natural e a outra foi esterilizada em autoclave por 50 minutos a 120°C.

Desenho experimental e análises

Cada porção de solo foi dividida em 10 potes onde foram plantadas duas sementes. Após o plantio, o experimento foi mantido em temperatura de aproximadamente 25 °C, fotoperíodo de 12 horas e luz branca com intensidade de aproximadamente 50 μMol m⁻² s⁻¹,

proporcionada por painéis de LED. Nos potes onde germinaram mais de uma semente, as plântulas excedentes foram removidas após três meses, mantendo a mais vigorosa, para que permanecesse apenas uma plântula por pote. Diariamente, a emergência das sementes era monitorada, até que o máximo de sementes tivesse germinado.

Dados para avaliações de crescimento (altura e número de folhas) foram coletados trimestralmente e ao final de 10 meses as plantas foram coletadas para as avaliações finais de crescimento e biomassa. Para a obtenção dos valores da proporção entre raiz e parte aérea foi realizada a seguinte equação: $\frac{MS \text{ raiz}}{MS \text{ raiz} + MS \text{ de parte aérea}}$. A proporção de parte aérea foi estimada como o restante da massa. Ao final do experimento também foi avaliada a taxa de colonização por ectomicorrizas.

Avaliações morfológicas

As medidas morfométricas de altura foram feitas com régua milimétrica. Medições de biomassa seca (MS) e biomassa fresca (MF) foram feitas com auxílio de uma balança de precisão. Para a obtenção da MF, todas as plantas foram divididas em raízes e parte aérea, sendo cada parte pesada separadamente. No caso do sistema radicular, anteriormente à pesagem foram realizadas as avaliações da presença de ECMs. Para a obtenção da MS, as plantas, divididas em raiz e parte aérea foram secas em estufa a 60 °C e pesadas periodicamente até que a massa se tornasse constante.

Presença/ausência de ectomicorrizas

Para o reconhecimento da presença de ectomicorrizas nas raízes, o sistema radicular foi cuidadosamente removido do solo, peneirado e lavado cuidadosamente em água corrente. Em seguida, todo o sistema radicular foi avaliado sob microscópio estereoscópico, observando diferenças nas características das raízes, como a mudança de cor, ramificação e espessamento. As raízes potencialmente identificadas como ectomicorrizas foram cortadas transversalmente a mão livre e observadas ao microscópio óptico para verificar a presença do manto e rede de Hartig. Para a quantificação das micorrizas foram contados o número total de pontas de raiz e esse número foi dividido pelo número de pontas que apresentavam ectomicorrizas, gerando um valor de taxa de ectomicorrização.

Análises estatísticas

Os resultados para dias de germinação, altura das plantas número de folhas e biomassa foram comparados usando o teste T de Student ou com análise de variância (ANOVA),

conforme o número de fatores. No caso ANOVA, as médias foram separadas através do teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos em todos os casos. As análises estatísticas foram executadas usando o programa Microsoft® Office Excel e JMP.

RESULTADOS

Germinação e desenvolvimento de plântulas

Houve pouca diferença na taxa de germinação entre os tratamentos, atingindo valores de 65% e 75% para o solo autoclavado e não autoclavado, respectivamente. Foi possível observar que as plântulas que permaneceram em um solo não esterilizado emergiram, em média, quatro dias antes daquelas que estavam em um solo esterilizado (Fig. 1).

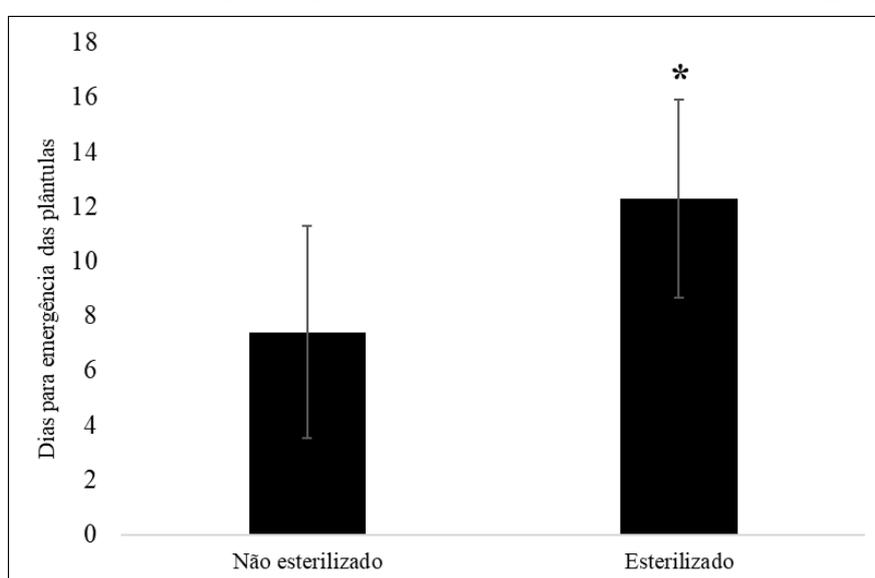


Fig. 1 Dias para a emergência de plântulas de *G. opposita* em solo natural de restinga esterilizado ou não. Asteriscos indicam diferenças significativas entre tratamentos, segundo o teste T de Student ($p < 0,05$).

Embora as plântulas do solo não esterilizado tenham emergido antes, não foram observadas diferenças no crescimento em altura das plantas quanto ao tipo de solo (Fig. 2A). O fator tempo, no entanto, mostrou um aumento significativo de 90 para 180 dias. Assim, foi possível observar que as plântulas do tratamento esterilizado, mesmo germinando mais tarde, alcançaram o mesmo padrão de altura do tratamento não esterilizado. Tanto o tempo quanto o tipo de solo influenciaram o número de folhas das plantas (Fig. 2B). É possível observar que o solo não esterilizado resultou em um maior número de folhas nas plantas. O número de folhas das plantas do solo esterilizado parece ter estabilizado após 90 dias, ao passo que as plantas cultivadas em solo não esterilizado pareciam continuar produzindo mais folhas pelo menos até 180 dias.

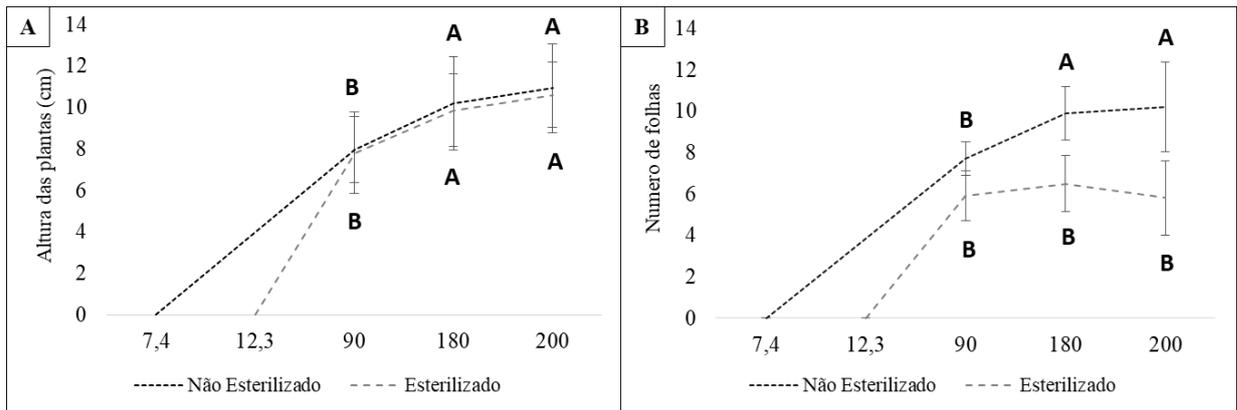


Fig. 2 Avaliação trimestral do crescimento em altura e número de folhas de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo natural de restinga esterilizado ou não. O ponto inicial para cada curva é a média de dias para germinação em cada tratamento. A- Altura das plantas (cm). B- Número de folhas. Letras diferentes indicam significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Análise final do crescimento das plantas

O tipo de solo não teve efeito significativo na altura das plantas ao final do experimento (Fig. 3A). Mesmo assim, foi possível observar uma diferença significativa no número de folhas, como já havíamos observado ao longo das avaliações (Fig. 3B). Também houve diferença para parte aérea (folhas e caules) em relação à biomassa fresca (Fig. 4A) e biomassa seca (Fig. 4B), observando maior biomassa para o solo não esterilizado. Estimamos que essa diferença se deve provavelmente ao maior número de folhas das plântulas em solo não esterilizado. Para raízes não houve diferenças em relação ao tipo de solo, tanto de biomassa fresca como de biomassa seca (Fig. 5), porém foi possível observar visualmente que em solo esterilizado o sistema radicular era mais alongado e em solo não esterilizado mais ramificado com raízes mais curtas. Observando a relação de biomassa de raiz para parte aérea podemos observar que as plantas do solo esterilizado investiram mais em raízes e as do solo não esterilizado investiram mais em parte aérea (Fig. 6).

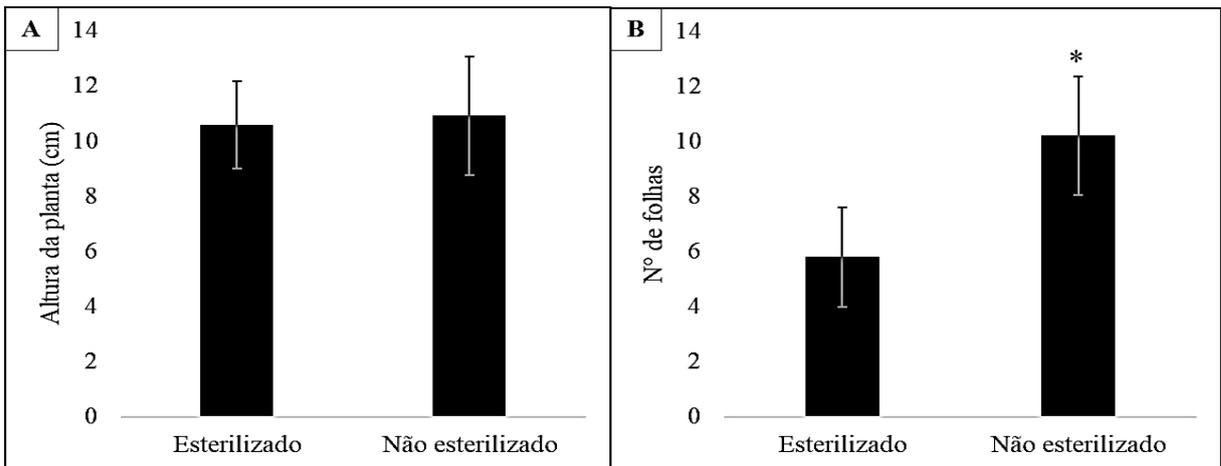


Fig. 3 Avaliação final para altura e número de folhas de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo natural de restinga esterilizado ou não. A- Altura das plantas (cm). B- Número de folhas. Asteriscos indicam diferenças significativas entre tratamentos, segundo o teste T de Student ($p < 0,05$).

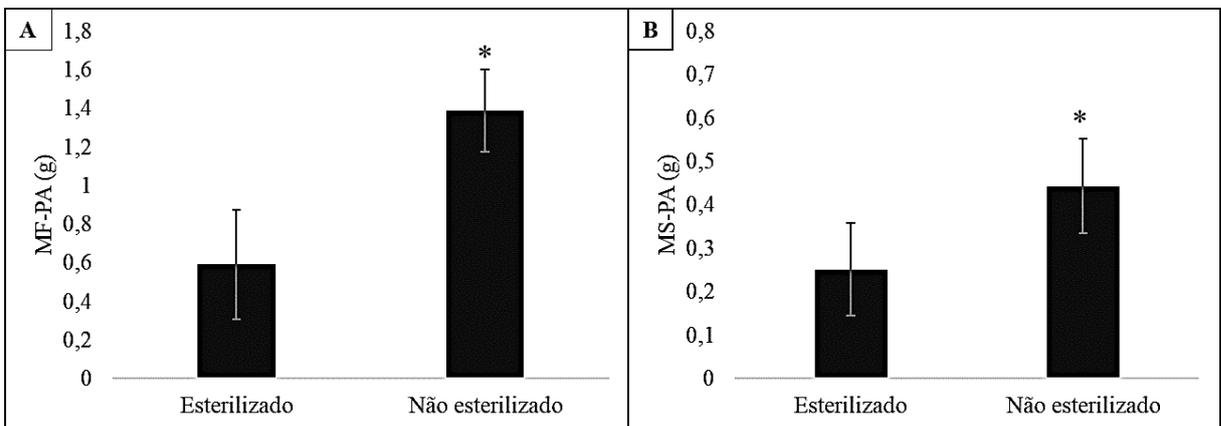


Fig. 4 Biomassa parte aérea (PA) de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo natural de restinga esterilizado ou não. A- Biomassa fresca (MF). B- Biomassa seca (MS). Asteriscos indicam diferenças significativas entre tratamentos, segundo o teste T de Student ($p < 0,05$).

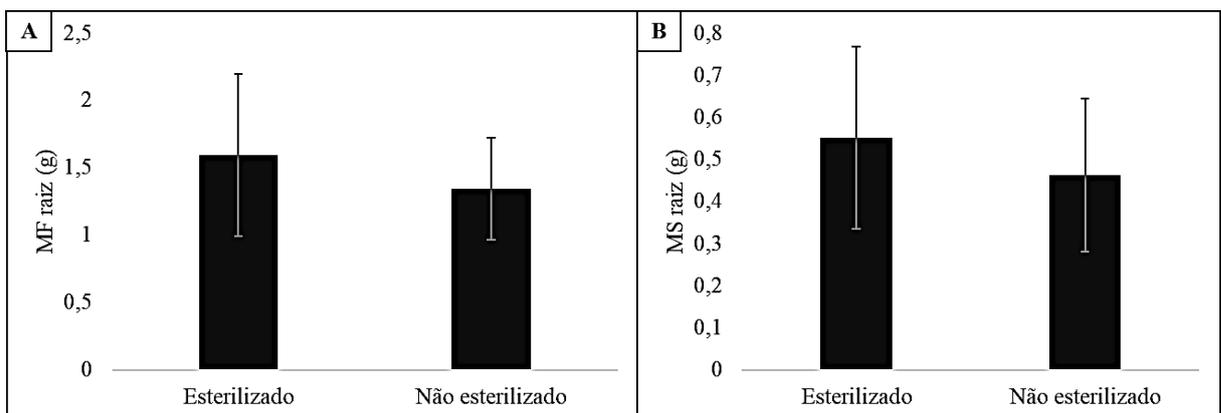


Fig. 5 Biomassa de raízes de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo natural de restinga esterilizado ou não. A- Biomassa fresca (MF). B- Biomassa seca (MS). Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos.

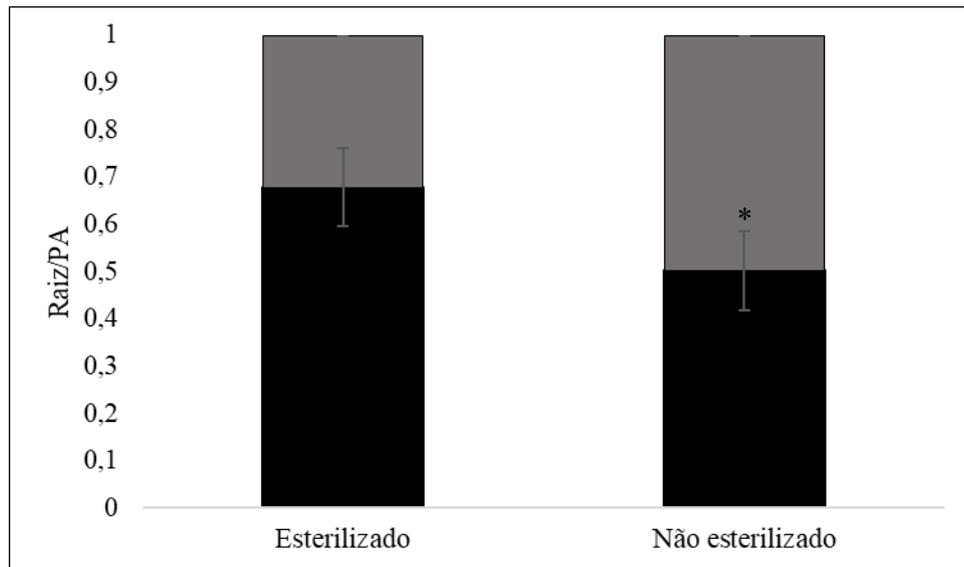


Fig. 6 Relação de biomassa seca de raiz para parte aérea (P.A.) de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo natural de restinga esterilizado ou não. Asteriscos indicam diferenças significativas entre tratamentos, segundo o teste T de Student ($p < 0,05$).

Colonização de raízes

Todas as plantas cultivadas em solo não esterilizado formaram ECMs em suas raízes. A média da taxa colonização ficou em 75,68% do total de pontas de raízes. Não foram encontradas pontas de raízes com ECM nas plantas cultivadas em solo esterilizado (Fig. 7). Nas plantas que apresentaram ECMs, foi possível identificar três morfotipos em microscópio estereoscópico (Ffig. 8A-B-C), o que pode indicar diferentes espécies de fungos se associando a *G. opposita*.

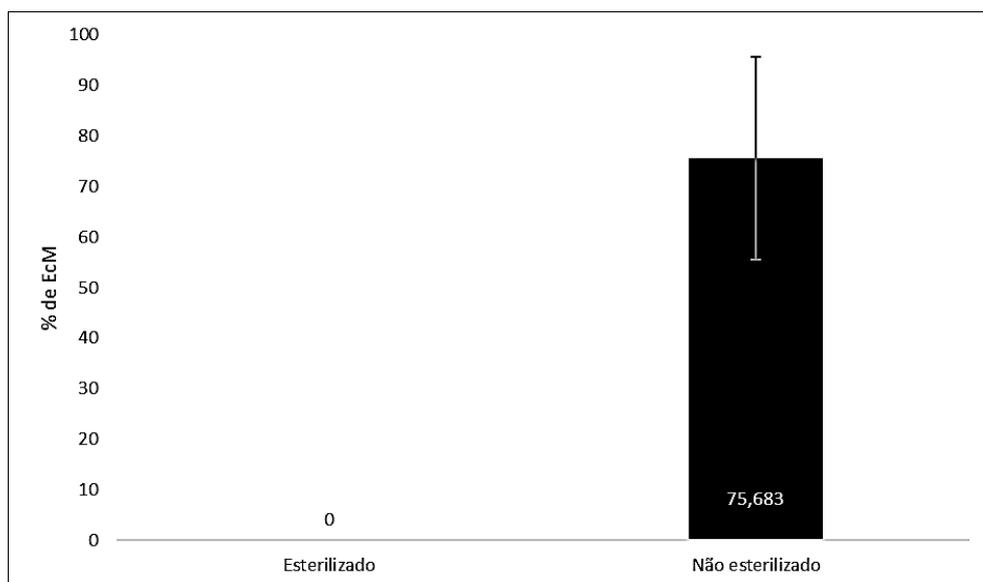


Fig. 7 Porcentagem de pontas de raízes apresentando ECMs em plantas de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo natural de restinga esterilizado ou não.

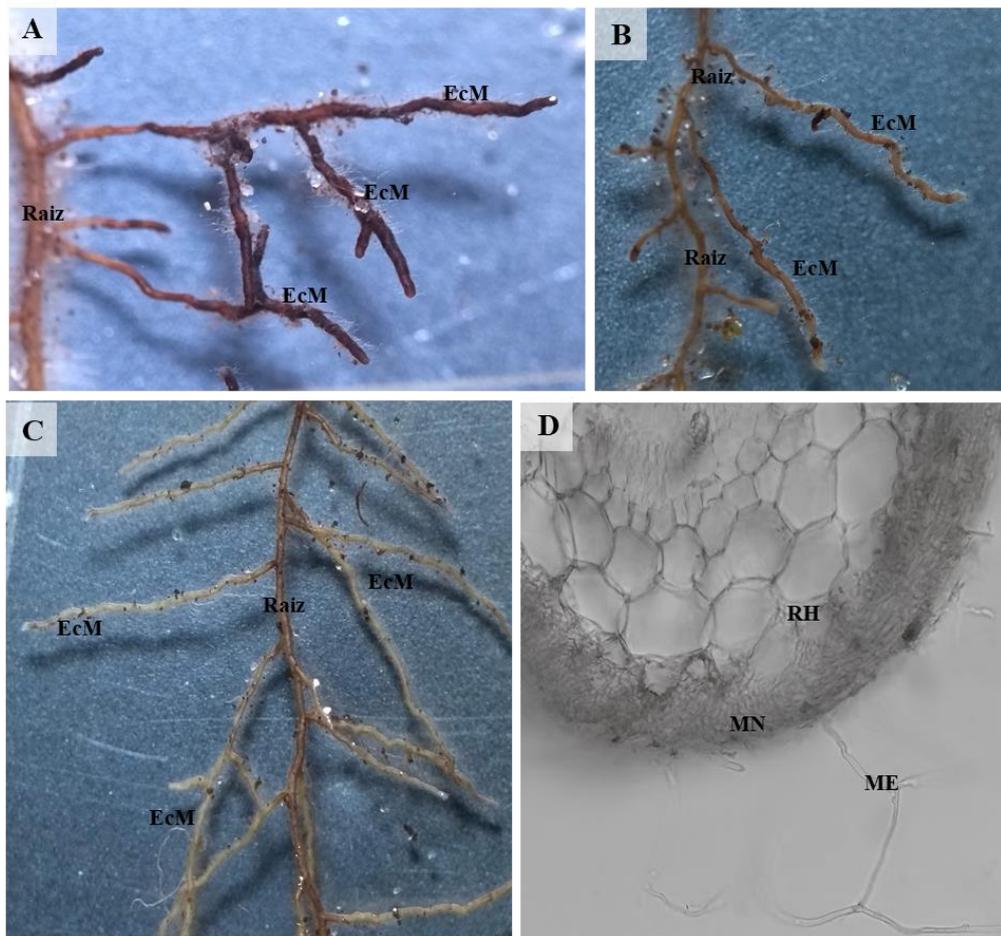


Fig. 8 Morfologia de ectomicorrizas em raízes de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo de Restinga. A-C - morfotipos; D- Secção transversal da raiz, mostrando as estruturas do morfotipo C. ECM – ectomicorriza; RH – Rede de Hartig; MN – manto; ME – micélio extrarradicar. Escala: C - 1 cm. Fonte: Slodkowski, MC. 2018

DISCUSSÃO

Neste trabalho, buscamos verificar se a microbiota nativa do solo de restinga altera o crescimento de plantas de *G. opposita* e se essa espécie é capaz de formar associações ectomicorrízicas com fungos presentes nesse solo.

Foi visto que a microbiota do solo parece influenciar o desenvolvimento da planta desde cedo, já que as sementes colocadas em solo não esterilizado emergiram mais rápido do que aquelas colocadas em solo esterilizado (Fig. 1). Uma possibilidade é que a microbiota do solo tenha acelerado o processo de germinação. Alguns trabalhos mostraram que, de fato, a microbiota do solo pode acelerar a germinação. Bakhshandeh et al. (2020) avaliaram os efeitos dos micro-organismos promotores do crescimento em *Glycine max* (L.) Merr sob condições ótimas e com estresse salino e seca, avaliando um total de 21 micro-organismos entre bactérias e fungos. Nos experimentos de Bakhshandeh et al. (2020) foi possível observar que os fungos *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, *T. lixii* (Pat.) P. Chaverri e *T. citrinoviride* Bissett,

promoveram uma maior germinação de *G. max* em relação ao controle (sementes não inoculadas) em condições ótimas. Quando em condições de estresse salino ou seca *T. longibrachiatum* e *T. simmonssi* também melhoraram a eficiência da germinação. Ainda, testando combinações entre bactérias e fungos, os autores observaram melhoras para germinação e crescimento sob estresse com a inoculação combinada das bactérias *Bacillus cereus* e *B. negaterium* e o fungo *T. simmonsii*. Lozano et al. (2017), observando o efeito do arbusto *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss. sobre espécies vizinhas, constataram um efeito positivo da microbiota do solo natural em relação ao esterilizado e o micro-habitat próximo do arbusto para a germinação de duas espécies: *Lagurus ovatus* L. e *Sisymbrium erysimoides* Desf.

No nosso experimento também existe a possibilidade de que o tempo de germinação não foi afetado, mas o desenvolvimento inicial da plântula sob o solo foi acelerado. Não encontramos publicações relacionadas a esse processo, mas por enquanto não podemos descartar essa possibilidade.

Foi possível observar que os micro-organismos que compõem o solo de restinga afetam o crescimento da *G. opposita*, principalmente relacionado à biomassa da parte aérea e ao número de folhas, mas sem influenciar significativamente na altura das plantas (Fig. 3-5). O crescimento da parte aérea das plantas está intimamente relacionado com a disponibilidade de nutrientes minerais que chegam ali. Fatores como disponibilidade no solo, capacidade de absorção e transporte dentro da planta determinam quanto nutriente atingirá as folhas. Todos esses processos podem ser alterados por microrganismos do solo já que plantas em associação com micro-organismos têm acesso a fontes diferenciadas de nutrientes, como por exemplo o P e N orgânico acessado através das ectomicorrizas, além da ampliação da zona de absorção (LAMBERS ET AL. 2008; MOMMER ET AL. 2016).

A biomassa da parte aérea foi maior nas plantas que cresceram em solo não esterilizado, mas essa diferença não foi observada para as raízes (Fig. 6). Diversos fatores bióticos e abióticos podem afetar a relação raiz/parte aérea das plantas, dentre eles o tipo de vegetação, a disponibilidade de nutrientes no solo, umidade e luminosidade figuram entre os principais, como mostrado em um levantamento realizado por Mokany et al. (2006), o qual revisou diversos estudos para demonstrar as razões raiz/parte aérea em relação ao estoque de carbono nos biomas terrestres. Uma vez que a luminosidade era a mesma para todas as plantas em nosso experimento, assumimos que o principal fator para as diferenças que observamos está na disponibilidade de nutrientes, potencializada de alguma forma pela microbiota do solo. Em outras palavras, acreditamos que, em solo esterilizado, as plantas tiveram que investir uma

proporção maior de seus recursos no sistema radicular, limitando o crescimento da parte aérea. Uma possível explicação para esse resultado é que a associação com os microrganismos, especialmente uma possível formação de ECM, tenha deixado o sistema radicular mais eficiente. Rodríguez-Echeverría et al. (2013) também encontraram resultados semelhantes ao avaliar o efeito da microbiota do solo no desempenho de uma comunidade de plantas próximas a *Retama sphaerocarpa* em relação a áreas abertas. Esse estudo avaliou um conjunto de 14 espécies, sendo que as plantas cultivadas em solos inoculados com extratos do solo de *R. sphaerocarpa* apresentaram maior biomassa de parte aérea, enquanto a biomassa de raízes não apresentou diferença. St-Denis et al. (2017) também observaram um efeito positivo no cultivo de mudas de *Quercus rubra* L. em solo natural, proveniente de áreas colonizadas por *Betula alleghaniensis* Britton, em relação ao mesmo solo esterilizado. Fakhech et al. (2019), também observaram um impacto significativo dos micro-organismos do solo no desenvolvimento da parte aérea em *Acacia gummifera* (Forssk.) Delile e *Retama monosperma* (L.) Boiss. ambas espécies de um sistema de dunas de areia estabilizadas da região de Essaouira, no Marrocos. Esses autores também mostraram que os teores de N e P eram maiores na parte aérea de plantas cultivadas em solo não esterilizado.

Não foi possível identificar as espécies de fungo presentes nas raízes das plantas de *G. opposita*, nem avaliar se os morfotipos seriam formas diferentes de uma mesma espécie ou espécies diferentes. Levantamentos de espécies ectomicorrízicas nas restingas ainda são extremamente escassos para embasar especulações nesse sentido. Sulzbacher et al. (2013) foram os primeiros a relatar espécies de fungos potencialmente ectomicorrízicas para estas regiões e Vanegas-León et al. (2019) apresentaram primeiro estudo a relatar esta simbiose ocorrendo na Ilha de Santa Catarina (Brasil), o que mostra o grande potencial de estudos nestes ambientes, mas a informação ainda é escassa.

Em nossa avaliação, encontramos pelo menos 3 morfotipos de ECMs associados às raízes de *G. opposita*. Considerando que usamos uma quantidade relativamente limitada de solo, suponhamos que no ambiente natural a diversidade de morfotipos seja bem maior.

CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou que os micro-organismos que compõem o solo de restinga afetam o crescimento da *Guapira opposita*, principalmente em relação ao número de folhas produzidas e, conseqüentemente, a biomassa da parte aérea. Também foi possível observar um efeito positivo em relação ao tempo de emergência das plântulas, porém esses efeitos precisam

ser melhor avaliados. Como já observado em diversas espécies da família Nyctaginaceae, comprovamos que esta espécie também faz associações ECMs em suas raízes, com pelo menos três morfotipos distinguíveis em uma avaliação preliminar. Estudos mais detalhados a respeito da anatomia dessa simbiose representam um importante caminho a seguir, e que podem ajudar a aprofundar os estudos de como essas associações afetam a fisiologia da *G. opposita* e, conseqüentemente, o funcionamento da comunidade de restinga.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ-MANJARREZ, J.; GARIBAY-ORIJEL, R.; SMITH, M. E. Caryophyllales are the main hosts of a unique set of ectomycorrhizal fungi in a Neotropical dry forest. **Mycorrhiza**, v. 28, n. 2, p. 103–115, 2018.

BÂ, A. M. et al. Ectomycorrhizal symbiosis of tropical African trees. **Mycorrhiza**, v. 22, n. 1, p. 1–29, 2012.

BAKSHANDEH, E. et al. Plant growth promoting microorganisms can improve germination, seedling growth and potassium uptake of soybean under drought and salt stress. **Plant Growth Regulation**, v. 90, n. 1, p. 123–136, 2020.

BERTNESS, M. D.; CALLAWAY, R. Positive interactions in communities. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 9, n. 5, p. 191–193, 1994.

BEVER, J. D. et al. Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 8, p. 468–478, 2010.

CORRALES, A.; HENKEL, T. W.; SMITH, M. E. Ectomycorrhizal associations in the tropics – biogeography, diversity patterns and ecosystem roles. **New Phytologist**, v. 220, n. 4, p. 1076–1091, 2018.

DALOTTO, C. E. S. **Fatores envolvidos no processo de facilitação pelo arbusto GUAPIRA OPPOSITA em ambientes de Restinga**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

DALOTTO, C. E. S. et al. Facilitation influences patterns of perennial species abundance and richness in a subtropical dune system. **AoB PLANTS**, v. 10, n. 2, p. 1–8, 2018.

FAKHECH, A.; OUAHMANE, L.; HAFIDI, M. Analysis of symbiotic microbial status of Atlantic sand dunes forest and its effects on *Acacia gummifera* and *Retama monosperma* (Fabaceae) to be used in reforestation. **Journal of Forestry Research**, 2019.

FALKENBERG, D. DE B. Aspectos da flora e da vegetação secundária da restinga de Santa Catarina, sul do Brasil. **INSULA Revista de Botânica**, v. 28, n. 0, p. 01, 1999.

FLORAM - FUNDAÇÃO MUNICIPAL DO MEIO AMBIENTE DE FLORIANÓPOLIS. **Monumento Natural Municipal da Lagoa do Peri**. Disponível em: <<
http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/imagens/18_12_2019_19_09_97f81e6b52fbd7da1a0ae715fb4f47dc.jpg>>

- GERZ, M. et al. Niche differentiation and expansion of plant species are associated with mycorrhizal symbiosis. **Journal of Ecology**, v. 106, n. 1, p. 254–264, 2018.
- GOMES, F. H. et al. Solos sob vegetação de Restinga na Ilha do Cardoso (SP). I - Caracterização e classificação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 1, p. 1563–1580, 2007.
- LAMBERS, H. et al. **Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age** *Trends in Ecology and Evolution* Elsevier Current Trends, , 1 fev. 2008.
- LOZANO, Y. M. et al. Disentangling above- and below-ground facilitation drivers in arid environments: the role of soil microorganisms, soil properties and microhabitat. **New Phytologist**, v. 216, n. 4, p. 1236–1246, 2017.
- MELO JÚNIOR, J. C. F. DE; BOEGER, M. R. T. Riqueza, estrutura e interações edáficas em um gradiente de restinga do Parque Estadual do Acaraí, Estado de Santa Catarina, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, n. 2, p. 207–232, 2015.
- MOKANY, K.; RAISON, R. J.; PROKUSHKIN, A. S. Critical analysis of root: Shoot ratios in terrestrial biomes. **Global Change Biology**, v. 12, n. 1, p. 84–96, 2006.
- MOMMER, L.; KIRKEGAARD, J.; VAN RUIJVEN, J. **Root-Root Interactions: Towards A Rhizosphere Framework** *Trends in Plant Science* Elsevier Ltd, , 1 mar. 2016.
- PEC, G. J. et al. The effects of ectomycorrhizal fungal networks on seedling establishment are contingent on species and severity of overstorey mortality. **Mycorrhiza**, p. 1–11, 2020.
- REITZ, P. R. **Flora ilustrada catarinense - Nyctaginaceas**. Itajaí: [s.n.].
- RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S. et al. A role for below-ground biota in plant-plant facilitation. **Journal of Ecology**, v. 101, n. 6, p. 1420–1428, 2013.
- RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S.; LOZANO, Y. M.; BARDGETT, R. D. Influence of soil microbiota in nurse plant systems. **Functional Ecology**, v. 30, n. 1, p. 30–40, 2016.
- ROY, M. et al. The (re)discovery of ectomycorrhizal symbioses in Neotropical ecosystems sketched in Florianópolis. **New Phytologist**, v. 214, n. 3, p. 920–923, 2017.
- SIMARD, S. W. et al. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. **Nature**, v. 388, n. 6642, p. 579–582, 1997.
- SIMARD, S. W. et al. Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 39–60, 2012.
- ST-DENIS, A. et al. Species-specific responses to forest soil inoculum in planted trees in an abandoned agricultural field. **Applied Soil Ecology**, v. 112, p. 1–10, 2017.
- SULZBACHER, M. et al. A survey of an ectotrophic sand dune forest in the northeast Brazil. **Mycosphere**, v. 4, n. 6, p. 1106–1116, 2013.
- SULZBACHER, M. A. et al. *Hysterangium atlanticum* sp. nov., forms ectomycorrhizae with *Coccoloba* species (Polygonaceae) from the Atlantic rainforest of Northeastern Brazil.

Symbiosis, v. 78, n. 3, p. 275–286, 15 jul. 2019.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A. et al. Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, n. 2, p. 178–187, 2006.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; HORTON, T. R. Socialism in soil? the importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. **Journal of Ecology**, v. 97, n. 6, p. 1139–1150, 2009.

VAN DER PUTTEN, W. H. et al. Plant-soil feedbacks: The past, the present and future challenges. **Journal of Ecology**, v. 101, n. 2, p. 265–276, 2013.

VANEGAS-LEÓN, M. L. et al. Are Trechisporales ectomycorrhizal or non-mycorrhizal root endophytes? **Mycological Progress**, v. 18, n. 9, p. 1231–1240, 2019.

**4 CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DO ACESSO À REDE MICELIAL NATURAL NO
CRESCIMENTO DE MUDAS DE *GUAPIRA OPPOSITA* (VELL.) REITZ
(NYCTAGINACEAE)**

RESUMO

Fungos ectomicorrízicos podem influenciar as plantas de diversas formas. Uma delas é através da rede de conexões formada quando o micélio fúngico se liga a diferentes plantas. Essas redes favorecem o estabelecimento, crescimento e a sobrevivência de mudas, podendo ser um ponto crítico para o estabelecimento das plantas em ambientes mais desafiadores. Um exemplo desses ambientes é a restinga, que compõe uma série de ecossistemas ao longo da costa brasileira, caracterizada por apresentar condições adversas como seca, alta salinidade e baixa disponibilidade de nutrientes. Na restinga, a *Guapira opposita* atua como nucleadora, facilitando o estabelecimento de outras espécies de plantas. Aqui, investigamos o potencial das árvores adultas já estabelecidas de *G. opposita* auxiliarem o crescimento de mudas da mesma espécie através da rede micelial comum das ectomicorrizas. Para isso, foram transplantadas mudas cultivadas por um ano em casa de vegetação para sacos de malha de nylon com diferentes tamanhos de poros e preenchidos com solo esterilizado, de forma que a malha bloqueava ou permitia o acesso do fungo à rede micelial comum, além de um controle sem nenhum tipo de malha. Os tratamentos foram dispostos em trios junto a uma população de árvores adultas de *G. opposita*, situada em uma área de restinga em Florianópolis, Brasil. Após oito meses, as plantas foram coletadas para avaliações morfométricas e da formação de ectomicorrizas no sistema radicular, calculando a taxa de colonização nas raízes. Não observamos diferenças significativas entre os tratamentos para nenhum parâmetro avaliado. Foi observada a presença de ectomicorrizas em todas as plantas, em taxas similares. Estimamos que a idade das plântulas, períodos de seca e a predação por formigas possam ter interferido em nossos resultados finais.

INTRODUÇÃO

Fungos e plantas habitam a grande maioria dos ecossistemas terrestres e ao formar associações simbióticas proporcionam vantagens para ambos, auxiliando na colonização de novos ambientes (SIMARD et al., 2012; VAN DER HEIJDEN et al., 2015). As micorrizas são exemplos destas associações, onde o fungo proporciona um aumento na absorção de nutrientes para a planta e, em troca recebe o carbono absorvido através da fotossíntese (SMITH; READ, 2008). Embora em ambientes tropicais e subtropicais, as associações micorrízicas do tipo arbusculares sejam as mais relatadas, estudos recentes vem enfatizando também a presença de associações ectomicorrízicas nesses ambientes (CORRALES; HENKEL; SMITH, 2018; ROY et al., 2017). No Brasil, nos últimos anos, vem sendo registrada a presença de fungos ectomicorrízicos (DUQUE BARBOSA et al., 2020; FURTADO; DANIËLS; NEVES, 2016; MAGNAGO et al., 2018; MAGNAGO; NEVES, 2014; ROY et al., 2016; SULZBACHER et al., 2013). Porém o estudo de plantas e fungos em associação ainda é escasso, por isso os trabalhos que dão ênfase neste processo acabam revelando táxons ainda desconhecidos como ectomicorrízicos e até mesmo novas espécies (SULZBACHER et al., 2019; VANEGAS-LEÓN et al., 2019).

Além de aumentar a absorção de nutrientes, as micorrizas podem estabelecer trocas de nutrientes entre plantas, através das redes miceliais comuns no solo. Em muitos casos, um mesmo fungo pode colonizar diversas plantas, e uma mesma planta pode ser colonizada por diversos fungos, formando uma extensa rede de comunicação extremamente importante (SIMARD et al., 1997, 2012). A transferência de nutrientes, principalmente carbono, nitrogênio e fósforo entre plantas, é um dos principais benefícios do acesso à rede micelial comum. Essa transferência pode ocorrer por diferentes processos, como o fluxo de massa, gerada por diferenças de nutrientes entre plantas ou por crescimento hifal, que permitiria o transporte de carbono e nutrientes em longa distância (HEATON et al., 2012).

Outro processo que vem sendo investigado nos últimos anos é o mecanismo de sinalização de defesas. Neste caso, moléculas ou sinais elétricos seriam transmitidos pela planta atacada, através das redes de micorrizas, desencadeando a ativação das defesas de plantas vizinhas (SONG et al., 2014; JOHNSON; GILBERT, 2015).

Todos os benefícios fornecidos pelo acesso à rede micorrízica comum acabam proporcionando vantagens principalmente para as mudas, já que ao se conectar a essa rede elas acabam recebendo uma maior quantidade de carbono e nutrientes do que teriam a capacidade de absorver e assimilar por suas próprias folhas ou raízes, impulsionando o crescimento e

sobrevivência (HE et al., 2009; BEILER et al., 2010; LEONARDI et al., 2018; PICKLES et al., 2017). Muitas vezes, as mudas crescem sob a copa de outras árvores tendo menos acesso à luz, fazendo com que elas entrem em competição com plantas adultas e eventualmente saiam prejudicadas. Nestes casos, a suplementação com carbono da rede de micorrízica pode ser vital (TESTE et al., 2009; BOOTH; HOEKSEMA, 2010). Além disso, Shi et al. (2017) mostraram que mudas de *Pinus thunbergii* Parlat., espécie intolerante à sombra, melhoraram a taxa de fixação de carbono em sombreamento, quando em associação ectomicorrízica. Tudo isso faz com que, em ambientes com condições adversas, que são ainda mais agressivos para as plântulas, essa comunicação seja ainda mais valiosa.

A restinga é considerada um ambiente altamente estressante para o estabelecimento de plantas, por isso acredita-se que a associação com fungos possa atenuar esses efeitos e proporcionar a colonização desses ambientes. Nas áreas de restinga, espécies como a *Guapira opposita* exercem um papel de nucleadoras, auxiliando o estabelecimento de outras espécies (DALOTTO et al., 2018). Estudos recentes vêm apontando uma forte importância dos microorganismos do solo e suas associações, como mediadores no processo de facilitação por plantas nucleadoras (Resultados apresentados no Cap. 1; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA; LOZANO; BARDGETT, 2016; LOZANO et al., 2017). Neste contexto, nosso objetivo foi verificar se mudas de *G. opposita* isoladas da rede micelial de ectomicorrizas (ECMs) têm o crescimento prejudicado quando comparadas a plantas conectadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O experimento foi conduzido junto à Unidade de Conservação Monumento Natural Municipal (MONA) da Lagoa do Peri, sob autorização nº 35/2019. O MONA está localizado ao Sul da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil (Fig. 1A). O MONA compreende uma área de 4.274,43 hectares e abriga uma importante área de restinga e Floresta Ombrófila Densa, assim como a bacia hidrográfica da Lagoa do Peri (FLORAM).

Desenho experimental

Frutos de *G. opposita* foram coletados em março de 2018 junto a uma população de *G. opposita* localizada no MONA da Lagoa do Peri. Em laboratório, os frutos foram despulpados e as sementes plantadas em sacos de polipropileno preenchidos com substrato de vermiculita e solo comercial vitamax (1:1). Em cada saco foram colocadas duas sementes. Após a germinação, plântulas foram removidas de forma que restasse apenas o indivíduo mais

vigoroso em cada saco. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação no Departamento de Botânica da UFSC.

Após um ano, todas as mudas foram transplantadas para sacos de nylon com malha de diferentes tamanhos de poro, contendo solo natural da restinga autoclavado. Todas as mudas não tinham diferença estatística em relação à altura. Antes de serem levadas a campo, as plântulas ainda permaneceram um mês em casa de vegetação para a aclimação ao substrato.

Tratamentos

1- Para excluir o acesso das mudas à rede natural de fungos, as mudas foram transplantadas para sacos de malha de nylon com poros de diâmetro de 1 μm . Este tamanho de poro é pequeno o suficiente para evitar que raízes ou hifas passem através da malha em qualquer direção (para dentro ou fora).

2- Para permitir o acesso das mudas à rede natural de fungos, as mudas foram transplantadas para sacos de malha com poros de 10 μm de diâmetro. Este tamanho de poro é grande o suficiente para permitir a passagem de hifas fúngicas, mas pequeno o suficiente para restringir a passagem das raízes.

3- Em um terceiro tratamento, as mudas foram plantadas diretamente no chão da floresta. Esse tratamento foi incluído para controlar o possível efeito dos sacos de malha. Antes de colocar a plântula no solo neste tratamento, o solo da floresta foi removido e substituído pelo mesmo que foi utilizado nos sacos de malha. Isto foi planejado para manter constante a perturbação inicial do solo em todos os tratamentos.

As mudas de *G. opposita* foram dispostas em trios, cada trio contendo uma repetição de cada tratamento, próximos da base de árvores adultas em uma direção aleatoriamente selecionada. Foi respeitada uma distância mínima de três metros entre cada grupo amostral (Fig. 1B). Os sacos de malha tinham dimensões de 20 cm de largura por 12,5 cm de profundidade. Cada tratamento foi replicado 18 vezes, totalizando 54 unidades amostrais. Para proteger as mudas de eventuais perturbações por visitantes do parque, foram colocadas garrafas PET transparentes cortadas ao redor de cada uma delas (Fig. 1C). Este experimento permaneceu durante oito meses em campo. Após este período, as mudas foram coletadas e as avaliações seguiram conforme o item abaixo.

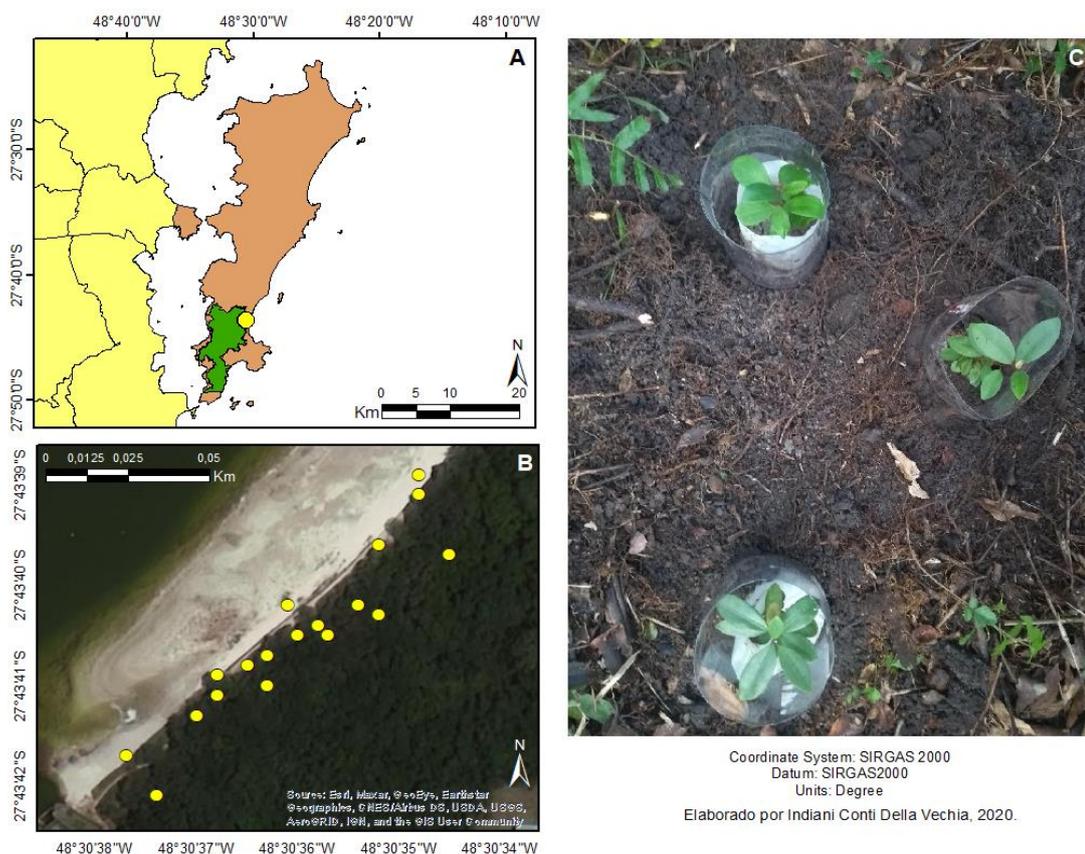


Figura 1- Localização das unidades experimentais. A - Localização do MONA e do local do experimento (Em amarelo destaca-se o estado de Santa Catarina; marrom o município de Florianópolis e verde o MONA da Lagoa do Peri; Ponto amarelo indica o local do experimento); B - Disposição dos trios junto a uma população de *G. opposita*; C - Composição dos trios com uma muda de cada tratamento.

Avaliações

Presença/ausência de ectomicorrizas

Para o reconhecimento da presença de ectomicorrizas nas raízes, todo o sistema radicular foi avaliado sob microscópio estereoscópico, observando diferenças nas características das raízes, como a mudança de cor, ramificação e engrossamento. As raízes potencialmente identificadas como ectomicorrizas foram cortadas transversalmente e observadas ao microscópio óptico para verificar a presença do manto e rede de Hartig. Para a quantificação das micorrizas foram contados o total de pontas e o total de pontas ectomicorrizadas. Ao final foi calculada a taxa de micorrização (pontas com ECM/ n° total de pontas de raízes).

Avaliações morfológicas

As medidas morfométricas de altura foram feitas com régua milimétrica. Medições de massa seca (MS) e massa fresca (MF) foram feitas com auxílio de uma balança analítica. Para

a obtenção da MF, todas as plantas foram divididas em raízes e parte aérea, sendo cada parte pesada separadamente. Para a obtenção da MS, as plantas já divididas em raiz e parte aérea foram secas em estufa a 65 °C e pesadas periodicamente até que a massa se tornasse constante. Para a obtenção dos valores da relação raiz/parte aérea foi realizada a seguinte equação: $MS \text{ raiz} / (MS \text{ raiz} + MS \text{ de parte aérea})$.

Análises estatísticas

Os resultados foram comparados através da análise de variância (ANOVA). As análises estatísticas foram executadas usando o programa JMP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final do experimento, 32 plantas foram recuperadas. A taxa de sobrevivência foi maior quando as plantas tiveram acesso à rede micelial, ficando em 61% no tratamento sem malha, 66% no tratamento com malha de 10 μ m e 50% no tratamento de malha com 1 μ m.

O tamanho dos poros em cada malha não mostrou diferenças no crescimento em altura das mudas de *G. opposita* (Fig. 2), assim como para a biomassa fresca e seca da parte aérea (Fig. 3) e raízes (Fig. 4). Foi constatada a presença de estruturas ectomicorrízicas em taxas semelhantes em todos os tratamentos (Fig. 6).

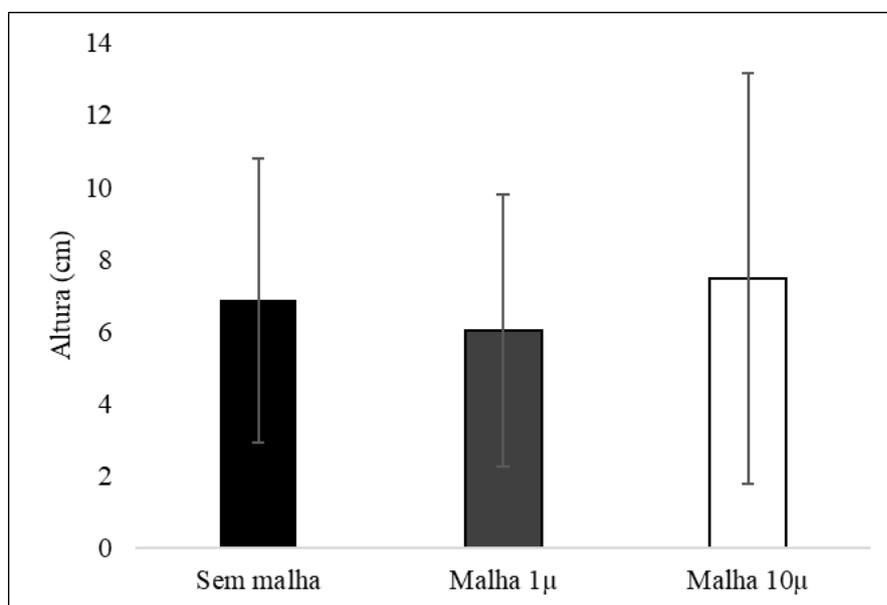


Figura 2 - Crescimento em altura de mudas de *G. opposita* após 8 meses submetidas ao cultivo em três tratamentos distintos. Preto: raízes em contato direto; Cinza: exclusão total; Branco: conexões hifais.

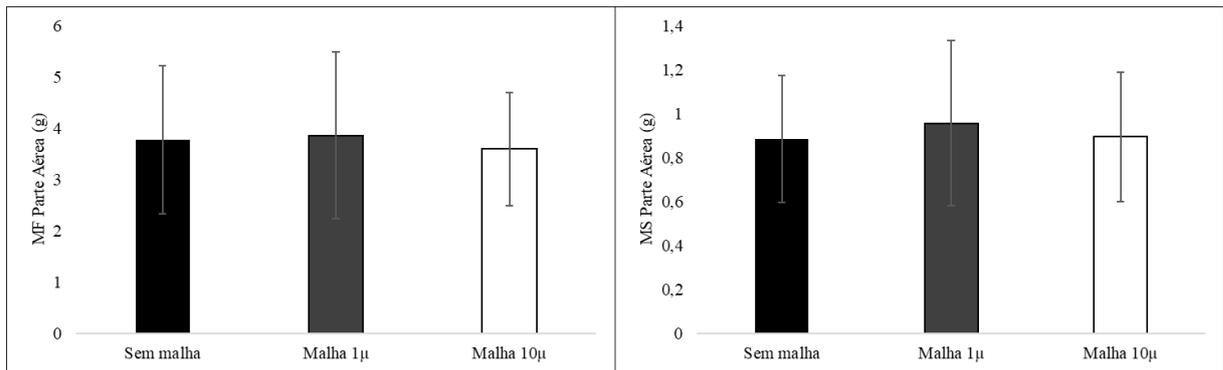


Figura 3 - Biomassa de parte aérea (caules e folhas) de mudas de *G. opposita* após oito meses submetidas ao cultivo em três tratamentos distintos. A) Biomassa fresca. B) Biomassa seca. Preto: raízes em contato direto; Cinza: exclusão total; Branco: conexões hifais.

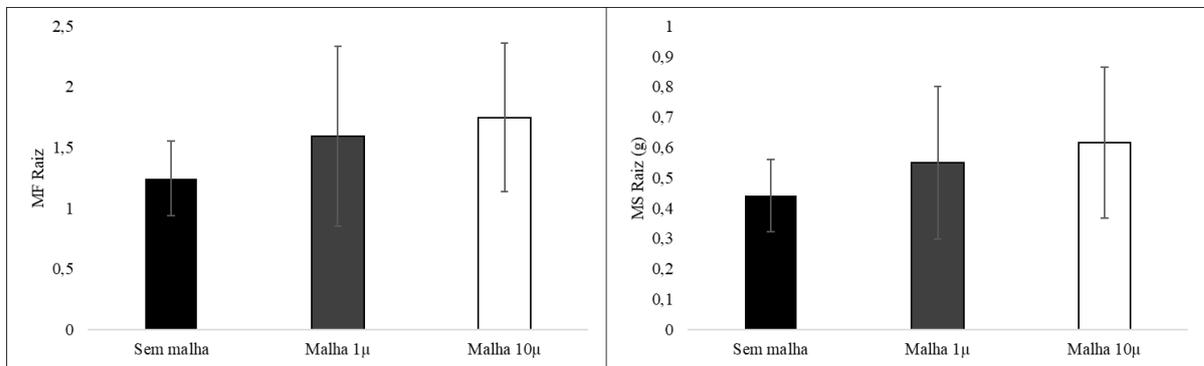


Figura 4 - Biomassa de raízes de mudas de *G. opposita* após oito meses submetidas ao cultivo em três tratamentos distintos. A) Biomassa fresca. B) Biomassa seca. Preto: raízes em contato direto; Cinza: exclusão total e Branco: conexões hifais.

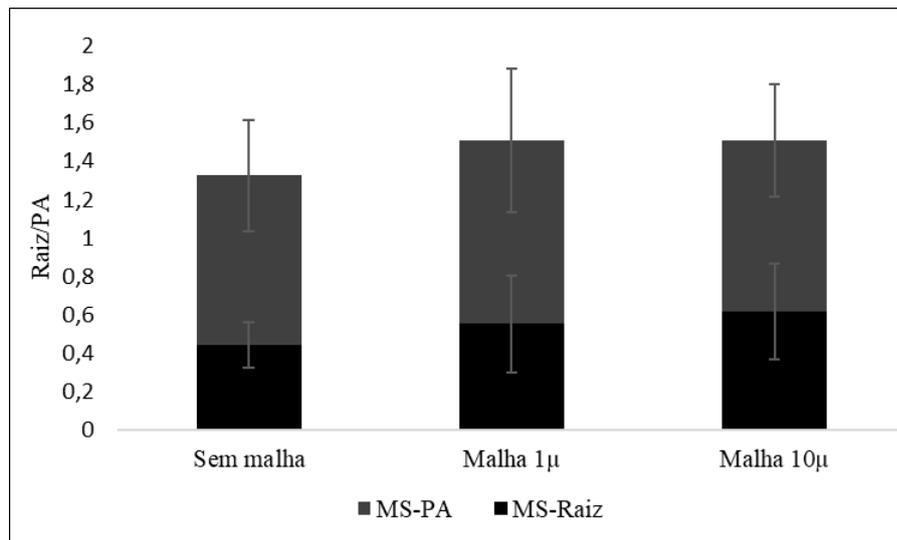


Figura 5 - Razão de massa de raízes para parte aérea (caules e folhas) de mudas de *G. opposita* após oito meses submetidas ao cultivo em três tratamentos distintos. Preto: raízes em contato direto; Cinza: exclusão total; Branco: conexões hifais.

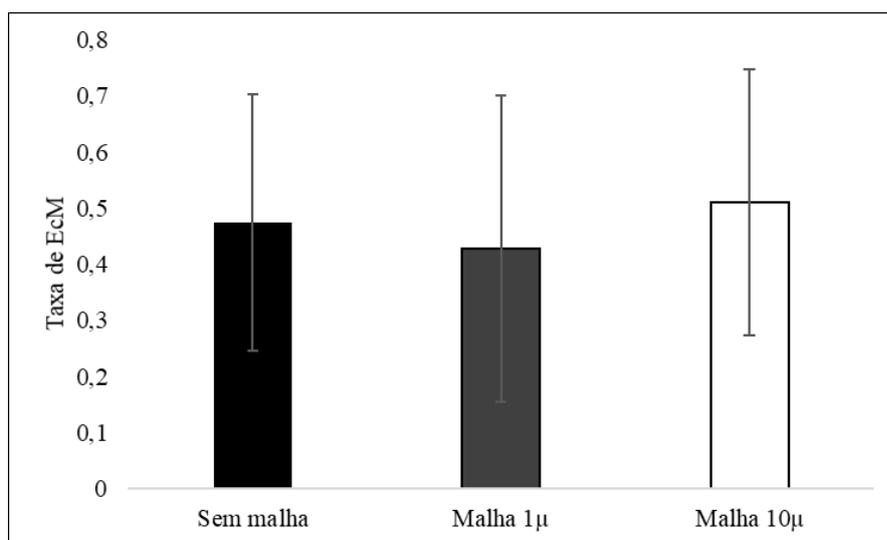


Figura 6 - Taxa de ectomicorrização de pontas de raízes plantas de *G. opposita* cultivadas por oito meses em solo natural de Restinga esterilizado ou não. Preto: raízes em contato direto; Cinza: exclusão total; Branco: conexões hifais.

Brearley et al. (2016) também não observaram diferenças significativas do efeito de exclusão de mudas do acesso à rede micelial comum do solo, de seis espécies de dipterocarpaceas da rede de ectomicorrizas em floresta tropical no sudeste da Ásia. Por outro lado, McGuiré (2007) constatou um aumento de 73% no crescimento, 55% em número de folhas e 47% na sobrevivência de mudas de *Dicymbe corymbosa* Spruce ex. Benth., com acesso à rede micelial comum. Nara (2006), também observou *in vitro*, diferenças positivas do acesso a redes ectomicorrízicas de 10 espécies de fungos por mudas de *Salix reinii* Franch. & Sav. Ainda, Liang et al. (2020) observaram o potencial das redes miceliais de micorrizas arbusculares e ectomicorrizas em auxiliar suas mudas e constataram que as ectomicorrizas exercem um efeito positivo na sobrevivência de mudas principalmente no primeiro ano de vida, enquanto que para micorrizas arbusculares foi menos significativo.

Não observamos diferenças significativas em nossas análises para o efeito das redes ectomicorrízicas no crescimento de *G. opposita*. Todavia, estimamos que alguns fatores podem ter influenciado em nossos resultados. Inicialmente, projetamos realizar a contagem de folhas, porém estes dados foram enviados pois constatamos que muitas folhas foram predadas por formigas, o que acabou afetando também os dados de biomassa. Mudas sob alta incidência solar foram as mais prejudicadas ou morreram. Também houve uma baixa incidência de chuvas no período do experimento, com apenas 455mm de chuvas sendo registrados para o período total do experimento, sendo que nos primeiros três meses apenas 45mm foram registrados (INMET)

Outro fator que consideramos foi a idade das mudas, como observado por Liang et al. (2020) e Teste et al. (2009), acreditamos que em plântulas mais jovens seria possível observar melhor o desenvolvimento ou talvez o tempo do experimento não foi o suficiente para detectar a influência da rede no crescimento das mudas. Também, o processo de esterilização do solo dentro dos sacos de malha pode ter retardado o processo de micorrização, talvez tenha dificultado a conexão da planta e por isso não observamos seus efeitos dentro do tempo de duração do experimento (é como se nosso experimento tivesse durado menos tempo, porque alguns meses podem ter se passado antes de termos a conexão dos micélios dentro e fora do saco de malha). Ainda, avaliamos que os locais que posicionamos nossas unidades experimentais diferiam entre si em relação ao microclima, tendo áreas de mata mais densa, borda de mata onde a incidência solar era mais branda e áreas com forte incidência solar, essa diferença também pode ter interferido na uniformidade de nossos dados mais do que os tratamentos aplicados.

Apesar de não termos observado diferenças significativas no crescimento das mudas, parece que as malhas tiveram um pequeno efeito na sobrevivência das mudas, o que estimamos que poderia ser melhor observado a longo prazo. Em uma futura repetição deste trabalho, sugerimos restringir o número de áreas, escolhendo áreas mais uniformes e aumentando o número de réplicas por área. Uma maior duração do experimento em campo também poderia deixar tendências mais marcadas a ponto de serem mais facilmente detectadas.

CONCLUSÃO

Avaliamos que em nossos experimentos não encontramos evidências suficientes para afirmar a influência das redes miceliais ectomicorrízicas no desenvolvimento de mudas de *G. opposita*. Alguns resultados, como a sobrevivência das mudas, no entanto, nos indicam que novos experimentos podem ser feitos para melhor compreensão do papel das ectomicorrizas na restinga.

REFERÊNCIAS

- BEILER, K. J. et al. Architecture of the wood-wide web: Rhizopogon spp. genets link multiple Douglas-fir cohorts. **New Phytologist**, v. 185, n. 2, p. 543–553, 1 jan. 2010.
- BOOTH, M. G.; HOEKSEMA, J. D. Mycorrhizal networks counteract competitive effects of canopy trees on seedling survival. **Ecology**, v. 91, n. 8, p. 2294–2302, 1 ago. 2010.
- BREARLEY, F. Q. et al. Testing the importance of a common ectomycorrhizal network for dipterocarp seedling growth and survival in tropical forests of Borneo. **Plant Ecology and Diversity**, v. 9, n. 5–6, p. 563–576, 1 nov. 2016.
- CORRALES, A.; HENKEL, T. W.; SMITH, M. E. Ectomycorrhizal associations in the tropics – biogeography, diversity patterns and ecosystem roles. **New Phytologist**, v. 220, n. 4, p. 1076–1091, 2018.
- DALOTTO, C. E. S. et al. Facilitation influences patterns of perennial species abundance and richness in a subtropical dune system. **AoB PLANTS**, v. 10, n. 2, p. 1–8, 2018.
- DUQUE BARBOSA, J. A. et al. A new section, *Lactifluus* section *Neotropicus* (Russulaceae), and two new *Lactifluus* species from the Atlantic Forest, Brazil. **Systematics and Biodiversity**, v. 18, n. 4, p. 347–361, 18 maio 2020.
- FLORAM - FUNDAÇÃO MUNICIPAL DO MEIO AMBIENTE DE FLORIANÓPOLIS. **Monumento Natural Municipal da Lagoa do Peri**. Disponível em: <<
http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/imagens/18_12_2019_19_09_97f81e6b52fbd7da1a0ae715fb4f47dc.jpg>>
- FURTADO, A. N. M.; DANIËLS, P. P.; NEVES, M. A. New species and new records of Clavariaceae (Agaricales) from Brazil. **Phytotaxa**, v. 253, n. 1, p. 1–26, 21 mar. 2016.
- HE, X. et al. Use of ¹⁵N stable isotope to quantify nitrogen transfer between mycorrhizal plants. **Journal of Plant Ecology**, v. 2, n. 3, p. 107–118, 1 set. 2009.
- HEATON, L. et al. Analysis of fungal networks. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 12–29, 1 abr. 2012.
- INMET - Instituto Nacional de Meteorologia – Disponível em: <<https://portal.inmet.gov.br/>>.
- JOHNSON, D.; GILBERT, L. Interplant signalling through hyphal networks. **New Phytologist**, v. 205, n. 4, p. 1448–1453, 1 mar. 2015.
- LEONARDI, M. et al. *Scleroderma meridionale* ectomycorrhizae on *Halimium halimifolium*: expanding the Mediterranean symbiotic repertoire. **Symbiosis**, v. 76, n. 2, p. 199–208, 2018.
- LIANG, M. et al. Soil fungal networks maintain local dominance of ectomycorrhizal trees. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 1 dez. 2020.
- LOZANO, Y. M. et al. Disentangling above- and below-ground facilitation drivers in arid environments: the role of soil microorganisms, soil properties and microhabitat. **New Phytologist**, v. 216, n. 4, p. 1236–1246, 2017.

- MAGNAGO, A. C. et al. A new species of gyroporus (Gyroporaceae, boletales) from atlantic forest in southern Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 107, n. 3–4, p. 291–301, 1 nov. 2018.
- MAGNAGO, A. C.; NEVES, M. A. New record of *Austroboletus festivus* (Boletaceae) from Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 37, n. 2, p. 197–200, 1 jun. 2014.
- MCGUIRE, K. L. Common Ectomycorrhizal Networks May Maintain Monodominance in a Tropical Rain Forest. **Ecological Society of America**, v. 88, n. 3, p. 567–574, 2007.
- NARA, K. Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. **New Phytologist**, v. 169, n. 1, p. 169–178, 2006.
- PICKLES, B. J. et al. Transfer of ^{13}C between paired Douglas-fir seedlings reveals plant kinship effects and uptake of exudates by ectomycorrhizas. **New Phytologist**, v. 214, n. 1, p. 400–411, 1 abr. 2017.
- RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S.; LOZANO, Y. M.; BARDGETT, R. D. Influence of soil microbiota in nurse plant systems. **Functional Ecology**, v. 30, n. 1, p. 30–40, 2016.
- ROY, M. et al. Diversity and Distribution of Ectomycorrhizal Fungi from Amazonian Lowland White-sand Forests in Brazil and French Guiana. **Biotropica**, v. 48, n. 1, p. 90–100, 2016.
- ROY, M. et al. The (re)discovery of ectomycorrhizal symbioses in Neotropical ecosystems sketched in Florianópolis. **New Phytologist**, v. 214, n. 3, p. 920–923, 2017.
- SHI, L. et al. Ectomycorrhizal fungi reduce the light compensation point and promote carbon fixation of *Pinus thunbergii* seedlings to adapt to shade environments. p. 823–830, 2017.
- SIMARD, S. W. et al. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. **Nature**, v. 388, n. 6642, p. 579–582, 1997.
- SIMARD, S. W. et al. Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 39–60, 2012.
- SMITH, S.; READ, D. **Mycorrhizal Symbiosis**. 3rd Editio ed. [s.l.] Academic Press, 2008.
- SONG, Y. Y. et al. Hijacking common mycorrhizal networks for herbivore-induced defence signal transfer between tomato plants. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 28 jan. 2014.
- SULZBACHER, M. et al. A survey of an ectotrophic sand dune forest in the northeast Brazil. **Mycosphere**, v. 4, n. 6, p. 1106–1116, 2013.
- SULZBACHER, M. A. et al. *Hysterangium atlanticum* sp. nov., forms ectomycorrhizae with *Coccoloba* species (Polygonaceae) from the Atlantic rainforest of Northeastern Brazil. **Symbiosis**, v. 78, n. 3, p. 275–286, 2019.
- TESTE, F. P. et al. Access to mycorrhizal networks and roots of trees: importance for seedling survival and resource transfer. **Ecology**, v. 90, n. 10, p. 2808–2822, 1 out. 2009.
- VAN DER HEIJDEN, M. G. A. et al. Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. **New Phytologist**, v. 205, n. 4, p. 1406–1423, 2015.

VANEGAS-LEÓN, M. L. et al. Are Trechisporales ectomycorrhizal or non-mycorrhizal root endophytes? **Mycological Progress**, v. 18, n. 9, p. 1231–1240, 2019.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível observar que a *Guapira opposita* forma associações ectomicorrízicas em suas raízes, além disso, observou-se que a microbiota do solo da restinga exerce influência no crescimento da planta principalmente na parte aérea. Destacamos ainda que não foram observadas diferenças entre a biomassa de raízes, o que significa que um mesmo tamanho do sistema radicular foi capaz de suportar uma biomassa maior da parte aérea quando a microbiota do solo estava presente. Neste contexto, especulamos que a ECM pode ser uma parte importante desse efeito, uma vez que foi detectada consistentemente sua presença nas raízes. Não foi possível observar diferenças significativas da influência das redes miceliais no crescimento de mudas da *G. opposita* em campo, porém esta hipótese não é descartada, visto que diversos fatores podem ter influenciado nos parâmetros avaliados.

Dentro deste trabalho, também iniciamos os estudos para cultivo *in vitro* da *G. opposita* e fungos ectomicorrízicos (consultar apêndices). Foi possível estabelecer um protocolo para a desinfecção das sementes para o cultivo *in vitro*, o que ainda não estava relatado em literatura. Porém, não obtivemos sucesso no cultivo de fungos ectomicorrízicos nativos da restinga. Este seria um importante passo, pois a partir do momento que tivermos os dois simbiontes isolados, seria possível projetar ensaios voltados para observar o processo de micorrização que acontece na *G. opposita* e suas influências. É possível especular algumas diferenças anatômicas nas ectomicorrizas observadas na restinga para o modelo tradicionalmente estudado em regiões de clima temperado do hemisfério norte. Esse enfoque já vem sendo discutido dentro do grupo de pesquisa.

Weidlich et al. (2020) ressaltaram o potencial das ectomicorrizas para a restauração da restinga. O fato de que a *G. opposita* é uma espécie abundante e facilitadora nestes ambientes mostra que estudos em relação à sua biologia e ecologia podem ser extremamente importantes também para aplicações na restauração ecológica.

A partir deste momento, especulam-se diversas outras perguntas para projetos futuros. Alguns exemplos são: Como acontece o processo de micorrização na *G. opposita*? Quem são os simbiontes fúngicos? Existem outras espécies vegetais que também realizam este tipo de associação na restinga? A ectomicorrização está favorecendo a planta na proteção contra estresses como a salinidade?

É evidente que novos estudos sobre a taxonomia, fisiologia, anatomia e ecologia de *G. opposita* e seus parceiros fúngicos podem revelar informações importantes sobre a dinâmica das espécies em restinga. Estudos como esses se fazem ainda mais importantes neste momento,

visto que a crescente especulação imobiliária ameaça a cada dia mais esses ambientes. Essa posição é endossada por diferentes órgãos governamentais tentativas de revogação de leis de proteção, como a Resolução nº 303/2002 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) que trata da proteção de ambientes como a restinga. Precisamos continuar mostrando com pesquisas e dados o quanto a preservação destes ambientes é de fato extremamente necessária.

6 REFERÊNCIAS

ALVAREZ-MANJARREZ, J. et al. *Tomentella brunneoincrustedata*, the first described species of the *Pisonieae*-associated Neotropical *Tomentella* clade, and phylogenetic analysis of the genus in Mexico. **Mycological Progress**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2016.

ALVAREZ-MANJARREZ, J.; GARIBAY-ORIJEL, R.; SMITH, M. E. Caryophyllales are the main hosts of a unique set of ectomycorrhizal fungi in a Neotropical dry forest. **Mycorrhiza**, v. 28, n. 2, p. 103–115, 2018.

BÂ, A. M. et al. Ectomycorrhizal symbiosis of tropical African trees. **Mycorrhiza**, v. 22, n. 1, p. 1–29, 2012.

BECQUER, A. et al. From soil to plant , the journey of P through trophic relationships and ectomycorrhizal association. v. 5, n. October, p. 1–7, 2014.

BRUNDRETT, M. C. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. **New Phytologist**, v. 154, n. 2, p. 275–304, 2002.

BRUNDRETT, M. C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: Understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. **Plant and Soil**, v. 320, n. 1–2, p. 37–77, 2009.

BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T.; AND MALAJCZUK, N. **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture**. Canberra Australia: ACIAR. 1996.

BRUNDRETT, M. C.; TEDERSOO, L. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. **New Phytologist**, v. 220, n. 4, p. 1108–1115, 2018.

CAIRNEY, J. W. G. Ectomycorrhizal fungi: The symbiotic route to the root for phosphorus in forest soils. **Plant and Soil**, v. 344, n. 1, p. 51–71, 2011.

CORRALES, A.; HENKEL, T. W.; SMITH, M. E. Ectomycorrhizal associations in the tropics – biogeography, diversity patterns and ecosystem roles. **New Phytologist**, v. 220, n. 4, p. 1076–1091, 2018.

DALOTTO, C. E. S. **Fatores envolvidos no processo de facilitação pelo arbusto GUAPIRA OPPOSITA em ambientes de Restinga**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

- DALOTTO, C. E. S. et al. Facilitation influences patterns of perennial species abundance and richness in a subtropical dune system. **AoB PLANTS**, v. 10, n. 2, p. 1–8, 2018.
- EKBLAD, A.; WALLANDER, H.; GODBOLD, D. L. The production and turnover of extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi in forest soils : role in carbon cycling. p. 1–27, 2013.
- FALKENBERG, D. DE B. Aspectos da flora e da vegetação secundária da restinga de Santa Catarina, sul do Brasil. **INSULA Revista de Botânica**, v. 28, n. 0, p. 01, 1999.
- GOMES, F. H. et al. Solos sob vegetação de Restinga na Ilha do Cardoso (SP). I - Caracterização e classificação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 1, p. 1563–1580, 2007.
- HAUG, I. et al. Russulaceae and Thelephoraceae form ectomycorrhizas with members of the Nyctaginaceae (Caryophyllales) in the tropical mountain rain forest of southern Ecuador. **New Phytologist**, v. 165, n. 3, p. 923–936, 2005.
- HAYWARD, J. A.; HORTON, T. R. Edaphic factors do not govern the ectomycorrhizal specificity of *Pisonia grandis* (Nyctaginaceae). **Mycorrhiza**, v. 22, n. 8, p. 647–652, 2012.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2 ed. ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1998.
- LU, M.; HEDIN, L. O. Global plant–symbiont organization and emergence of biogeochemical cycles resolved by evolution-based trait modelling. **Nature Ecology and Evolution**, v. 3, n. 2, p. 239–250, 2019.
- LUO, Z. BIN et al. The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 108, p. 47–62, 2014.
- MCGUIRE, K. L. Common Ectomycorrhizal Networks May Maintain Monodominance in a Tropical Rain Forest. **Ecological Society of America**, v. 88, n. 3, p. 567–574, 2007.
- MELO JÚNIOR, J. C. F. DE; BOEGER, M. R. T. Riqueza, estrutura e interações edáficas em um gradiente de restinga do Parque Estadual do Acaraí, Estado de Santa Catarina, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, n. 2, p. 207–232, 2015.

MOORE, D.; ROBSON, G. D.; TRINCI, A. P. J. **21st Century Guidebook to Fungi**. New York, USA: Cambridge University Press, 2011.

MURASHIGE, T. SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum** 15(3): 473-497, 1962.

NARA, K. Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. **New Phytologist**, v. 169, n. 1, p. 169–178, 2006.

REITZ, P. R. **Flora ilustrada catarinense - Nyctaginaceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 1970.

ROY, M. et al. Diversity and Distribution of Ectomycorrhizal Fungi from Amazonian Lowland White-sand Forests in Brazil and French Guiana. **Biotropica**, v. 48, n. 1, p. 90–100, 2016.

ROY, M. et al. The (re)discovery of ectomycorrhizal symbioses in Neotropical ecosystems sketched in Florianópolis. **New Phytologist**, v. 214, n. 3, p. 920–923, 2017.

RUBINI, M. R. et al. Diversidade da comunidade fúngica endofítica do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) e controle biológico de *Crinipellis pernicioso*, agente causal da doença da vassoura de bruxa. **Jornal Internacional de Ciências Biológicas** , v. 1, n. 1, pág. 24, 2005.

SÁ, C. F. C. Nyctaginaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Disponível em <<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10913>>> , 2015.

SA, G. et al. SA, G. et al. Amelioration of nitrate uptake under salt stress by ectomycorrhiza with and without a Hartig net. **New Phytologist**, v. 222, n. 4, p. 1951–1964, 2019. Amelioration of nitrate uptake under salt stress by ectomycorrhiza with and without a Hartig. **New Phytologist**, v. 222, n. 4, p. 1951–1964, 2019.

SAIKKONEN, K. et al. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 319–343, 1998.

SIMARD, S. W. et al. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. **Nature**, v. 388, n. 6642, p. 579–582, 1997.

SINGER, ROLF; ARAUJO, I.; IVORY., M. H. The ectotrophically mycorrhizal fungi of the

neotropical lowlands, especially central Amazonia.(Litter decomposition and ectomycorrhiza in Amazonian forests 2.). **Nova Hedwigia**, v. 77, 1983.

SINGER, R.; ARAUJO, I. DE J. DA S. Litter decomposition and Ectomycorrhiza in Amazonian forests. 1. A comparison of litter decomposing and ectomycorrhizal Basidiomycetes in latosol-terra-firme rain forest and white podzol campinarana. **Acta Amazonica**, v. 9, n. 1, p. 25–42, mar. 1979.

SMITH, M. E. et al. Ectomycorrhizal fungal diversity and community structure on three co-occurring leguminous canopy tree species in a Neotropical rainforest. **New Phytologist**, v. 192, n. 3, p. 699–712, 2011.

SMITH, M. E. et al. The Ectomycorrhizal Fungal Community in a Neotropical Forest Dominated by the Endemic Dipterocarp *Pakaraimaea dipterocarpacea*. v. 8, n. 1, p. 1–13, 2013.

SMITH, S. E.; ANDERSON, I. C.; SMITH, F. A. **MYCORRHIZAL ASSOCIATIONS AND PHOSPHORUS ACQUISITION : FROM CELLS TO ECOSYSTEMS**. [s.l.: s.n.]. v. 48

SMITH, S.; READ, D. **Mycorrhizal Symbiosis**. 3rd Editio ed. [s.l.] Academic Press, 2008.

SULZBACHER, M. et al. A survey of an ectotrophic sand dune forest in the northeast Brazil. **Mycosphere**, v. 4, n. 6, p. 1106–1116, 2013.

TEDERSOO, L. et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science (New York, N.Y.)**, v. 346, n. 6213, p. 1052–1053, 2014.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A. et al. Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. **New Phytologist**, v. 205, n. 4, p. 1406–1423, 2015.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; HORTON, T. R. Socialism in soil? the importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. **Journal of Ecology**, v. 97, n. 6, p. 1139–1150, 2009.

VANEGAS-LEÓN, M. L. **ECTOMICORRIZAS TROPICAIS: ESTUDOS DE CASONA MATAATLÂNTICA**. [s.l.] Univerdidade Federal de Santa Catarina, 2017.

VANEGAS-LEÓN, M. L. et al. Are Trechisporales ectomycorrhizal or non-mycorrhizal root endophytes? **Mycological Progress**, v. 18, n. 9, p. 1231–1240, 2019.

WEIDLICH, E. W. A. et al. Using ectomycorrhizae to improve the restoration of Neotropical coastal zones. **Restoration Ecology**, p. rec.13284, 28 out. 2020.

WU, B. et al. Structural and functional interactions between extraradical mycelia of ectomycorrhizal Pisolithus isolates. **New Phytologist**, v. 194, n. 4, p. 1070–1078, 2012.

7 APÊNDICES

7.1 APÊNDICE 1 – TESTES PARA CULTIVO *IN VITRO* DE *G. OPPOSITA* E FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS

Cultivo in vitro de *Guapira opposita*

Desinfestação das sementes

Para a padronização do processo de desinfestação das sementes e estabelecer um protocolo de desinfestação para as sementes de *G. opposita* foram testados inicialmente alguns tempos de permanência das sementes em álcool 70% e hipoclorito de sódio 0,5%, observando o padrão de contaminação começando com tempos mínimos (30s/2min. respec.). Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar e as vidrarias utilizadas foram previamente autoclavadas durante 20 min, a 120°C para esterilização.

Teste de germinação

Para observar o padrão de germinação das sementes de *G. opposita* realizamos testes prévios com a aplicação de 500µM de giberelina (GA), comparando com a germinação natural e esterilização com álcool 70% e hipoclorito de sódio 0,5%. Colocamos 4 repetições para cada tratamento com 25 sementes em cada.

Germinação in vitro

Após a desinfecção, as sementes foram postas para germinar em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), tapados com filmes de polietileno. As plântulas foram mantidas na temperatura de aproximadamente 25 °C, fotoperíodo de 12 horas e luz branca com intensidade de aproximadamente 50 µMol m⁻² s⁻¹, proporcionada por painéis LED.

Isolamento e cultivo de fungos ectomicorrízicos

Basidiomas reconhecidamente ectomicorrízicos foram coletados na restinga da ilha de Santa Catarina. Os isolados foram produzidos seguindo as recomendações de BRUNDRETT et al. (1996). Em câmara de fluxo laminar o basidioma é partido ao meio e são obtidas pequenas porções estéreis do estipe e lamelas que são depositadas em placas de Petri com meio Agar Batata (BSA). As culturas foram incubadas em temperatura entre 20 e 25°C. Réplicas dos isolados foram feitas para a tentativa de obtenção da cultura pura.

Resultados

Esterilização de sementes

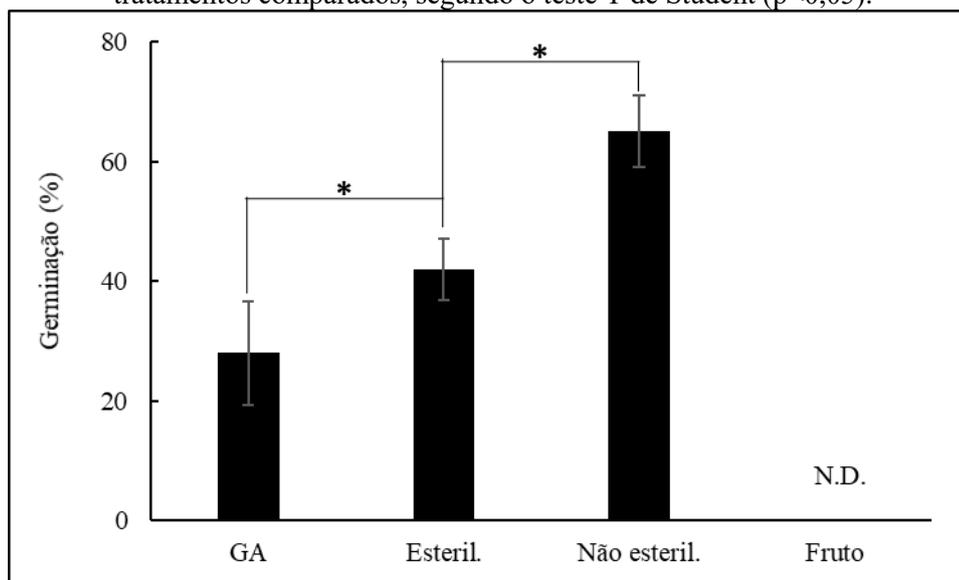
Foi possível observar que as sementes suportam bem os procedimentos de desinfestação. Estabelecemos os tempos de 2 min de imersão em álcool 70% e 45 min em

solução de hipoclorito de sódio 0,5% são necessários para uma completa desinfecção das sementes.

Teste de germinação

As sementes germinam naturalmente bem dentro de cinco a dez dias e que são capazes de tolerar a esterilização, embora com alguma perda de viabilidade (fig. 01). Surpreendentemente, a aplicação de GA reduziu a porcentagem de germinação das sementes. Também foi visto que as sementes não beneficiadas dificilmente germinam, indicando a possibilidade de algum mecanismo de dormência química imposto pelo fruto.

Figura 01- Índice de germinação de sementes de *G. opposita* considerando diferentes situações: com a aplicação de hormônio giberelina (GA) e esterilização, com a esterilização das sementes por 30 seg. em álcool 70% e 2 min. em hipoclorito de sódio 0,5% (Esteril.), não esterilizando as sementes (Não esteril.) e utilizando o fruto inteiro (Fruto). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos comparados, segundo o teste T de Student ($p < 0,05$).



Isolamento de fungos

Para o isolamento de fungos, 17 espécimes foram cultivados em meio de cultura BDA (Ágar batata), porém não obtivemos sucesso no isolamento de uma cultura pura (Tab. 01). Na maioria dos casos não ocorreu o desenvolvimento do micélio. Em dois casos que obtivemos sucesso no cultivo, ao realizar a identificação por procedimentos de biologia molecular os isolados foram identificados como *Fusarium* spp.; grupo identificado como contaminante, por não ser do grupo de interesse para este estudo.

Tabela 1: Fungos ectomicorrízicos cultivados em meio Ágar Batata (BDA).

Data	Espécie	Local	Obs.
29/01/18	<i>Amanita</i> sp.	Restinga Rio Tavares	Não desenvolveu
21/07/18	<i>Ramaria</i> sp.	Costão do santinho	Não desenvolveu
25/10/18	<i>Amanita</i> sp.	Lagoinha do Leste	Biomol-contaminação
25/10/18	<i>Amanita</i> sp.	Lagoinha do Leste	Não desenvolveu
09/11/18	<i>Lactifluus</i> sp.	Morro da Lagoa	Contaminou
05/01/19	<i>Amanita lanivolva</i>	Morro da Lagoa	Biomol-contaminação
18/01/19	<i>Clavulina</i> sp.	Morro da Lagoa	Não desenvolveu
18/01/19	<i>Lactifluus</i> sp.	Morro da Lagoa	Contaminou
18/01/19	<i>Lactifluus</i> sp.	Morro da Lagoa	Contaminou
18/01/19	<i>Lactifluus</i> sp.	Morro da Lagoa	Não desenvolveu
18/01/19	Boletales	Morro da Lagoa	Não desenvolveu
18/01/19	<i>Lactifluus</i> sp.	Morro da Lagoa	Não desenvolveu
15/03/19	<i>Lactifluus</i> sp.	Morro da Lagoa	Não desenvolveu
15/03/19	<i>Russula puigarii</i>	Morro da Lagoa	Contaminou
15/03/19	<i>Russula puigarii</i>	Morro da Lagoa	Não desenvolveu
06/06/19	<i>Amanita viscidolutea</i>	MONA Peri	Não desenvolveu
06/06/19	<i>Austroboletus festivus</i>	MONA Peri	Não desenvolveu

7.2 APÊNDICE 2 - PROTOCOLO PARA CULTIVO *IN VITRO* DE *GUAPIRA OPPOSITA*

- *Armazenamento e preparo*

Os frutos coletados devem ser armazenados em geladeira por no máximo duas semanas e despolpados apenas momentos antes da realização dos procedimentos. A despolpa pode ser realizada com auxílio de uma peneira ou toalhas de papel descartáveis.

- *Desinfestação*

As sementes despolpadas devem ser imersas em álcool 70% por 2 min, lavadas 1 vez em água destilada esterilizada, imersas novamente por 45 min em solução de hipoclorito de sódio 0,5% agitando constantemente, e lavadas por mais 4 vezes em água destilada autoclavada.

Todos os procedimentos devem ser realizados em câmara de fluxo laminar e as vidrarias utilizadas devem ser previamente autoclavadas durante 20 min, a 120°C para esterilização.

