

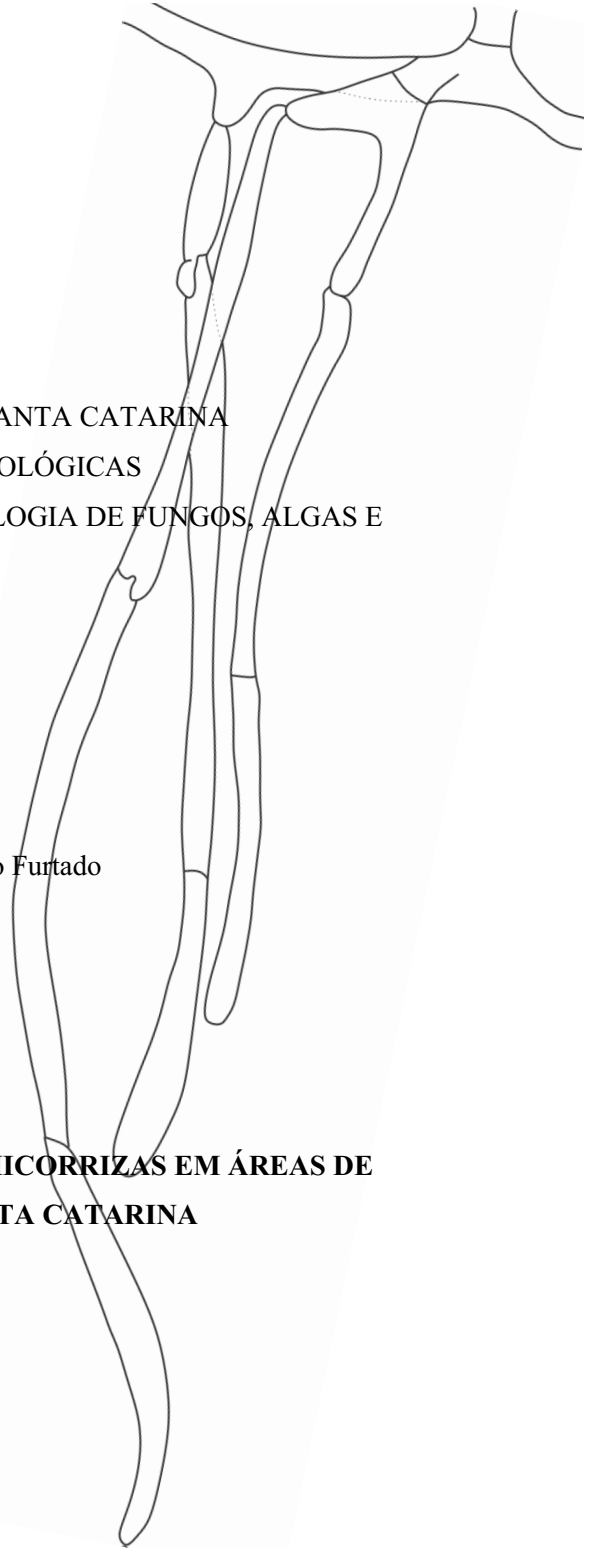


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS, ALGAS E  
PLANTAS

Ariadne Nóbrega Marinho Furtado

**INTERAÇÃO E DIVERSIDADE DE ECTOMICORRIZAS EM ÁREAS DE  
RESTINGA DA ILHA DE SANTA CATARINA**

Florianópolis  
2022





Ariadne Nóbrega Marinho Furtado

**INTERAÇÃO E DIVERSIDADE DE ECTOMICORRIZAS EM ÁREAS DE  
RESTINGA DA ILHA DE SANTA CATARINA**

Dissertação/Tese 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 Doutor em Biologia de Fungos, Algas e Plantas

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Maria Alice Neves, Dra.

Coorientador: Prof. Andrea C. Rinaldi, Dr.

Florianópolis

2022

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

Furtado, Ariadne Nóbrega Marinho  
Interação e diversidade de ectomicorrizas em áreas de  
restinga da Ilha de Santa Catarina / Ariadne Nóbrega  
Marinho Furtado ; orientadora, Maria Alice Neves,  
coorientador, Andrea C. Rinaldi, 2022.  
97 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas,  
Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2.  
Ectomicorriza. 3. Restinga. 4. Morfologia. 5. Neotrópicos.  
I. Neves, Maria Alice. II. Rinaldi, Andrea C.. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

Ariadne Nóbrega Marinho Furtado

**Interação e diversidade de ectomicorrizas em áreas de restinga da Ilha de Santa Catarina**

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

Melanie Roy, Dra.

Université Paul Sabatier – IRL IFAECI, França

Julieta Álvarez-Manjarrez, Dra.

Stanford University, EUA

Mayara Krasinski Caddah, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

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



Documento assinado digitalmente  
Fernanda Maria Cordeiro de Oliveira  
Data: 10/06/2022 13:07:21-0300  
CPF: 059.315.629-31  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

---

Prof.<sup>a</sup> Fernanda Maria Cordeiro de Oliveira, Dra.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação



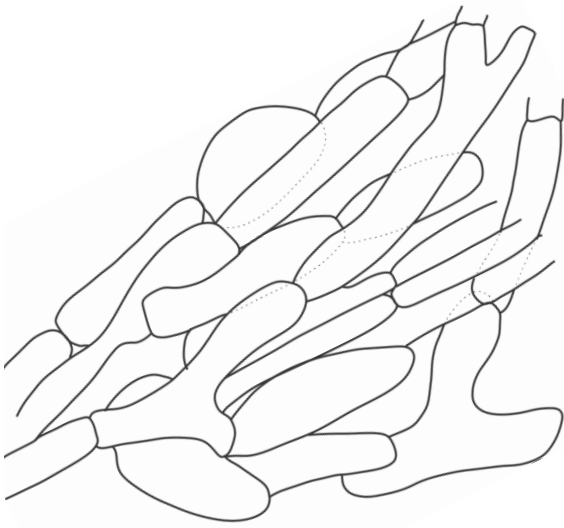
Documento assinado digitalmente  
Maria Alice Neves  
Data: 09/06/2022 18:01:15-0300  
CPF: 889.374.539-91  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

---

Prof.<sup>a</sup> Maria Alice Neves, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 31 de maio de 2022.



À minha família, sempre. Amo vocês em qualquer esfera.

## AGRADECIMENTOS

Assim como muitos, eu nunca me imaginei apresentando uma tese e defendendo meu doutorado numa situação pós-pandêmica, após 2 anos vivendo um mundo de incertezas, no país do descaso. Várias pessoas foram essenciais para eu estar aqui hoje, e eu sou eternamente grata a todas elas.

Parece que foi ontem que meus olhos se encantaram com o mundo dos fungos e bati à porta da professora Maria Alice à procura de estágio. Eu jamais apostaria comigo mesma, ansiosa, inquieta e com aquela eterna pulga atrás da orelha que hoje eu estaria aqui, quase 15 anos depois, micóloga e a concluir uma das etapas mais importantes de minha formação profissional, e ao lado da mesma incrível mulher que impulsionara tudo desde o começo. Agradeço a Maria Alice por ter me contagiado com uma de suas paixões, por ter me dado a liberdade de explorar enquanto cientista em formação e por me apoiar em minhas decisões. Obrigada por me mostrar que essa vida é feita de paixão, respeito e humildade, que a ciência se faz para todos e por tentar me manter respirando fungo, sempre. Entre tantos cafezinhos e reuniões, saídas de campo, risotos e cervejinhas, agradeço por termos construído uma amizade para além dos muros da universidade.

Agradeço às conexões que o micélio me trouxe, meu ecto-team além-mar, Ornella Comandini, Andrea Rinaldi e Marco Leonardi, que me receberam de braços abertos durante minha estada na Itália, me incluíram em suas famílias e me ensinaram tudo que estava sob seus domínios. Todas as discussões com vocês foram e são muito valiosas. *Gratzias meda!*

Ao Micolab que foi minha segunda casa durante o período do mestrado e do doutorado. Agradeço pelas reuniões enriquecedoras, os cafés micológicos e os arranca-rabos construtivos. Cresci muito enquanto pessoa e profissional ao lado de todos que integraram ou integram o laboratório. Ao grupo “Tropico Ectomicorrizas” pelas conversas construtivas e constantes piadas infames. Micorrizam se eu estiver errada, mas nem o céu será o limite para nós! Agradeço aquelas pessoas que me acompanharam nas expedições a campo e passaram longas horas tratando solo e triando raízes nos finais de semana comigo, em especial a Lara Ferst, que além da companhia e trabalho árduo, sempre me regou com as mais construtivas conversas dentro e fora do universo fúngico. O mundo é pequeno para você, criatura!

Não poderia deixar de agradecer a elas, as duas mulheres mais importantes de minha vida, Clécia (mainha) e Shaka, que sempre foram minhas inspirações e fortaleza, e não me deixaram cair nem nos mais difíceis momentos. Obrigada por apoiarem meus sonhos, quaisquer que sejam, e por seguirem me lembrando o quão capaz eu sou. Obrigada pelo amor, confiança e dedicação comigo sempre! A painho Nonato e Axell (PRESENTES!). Sigo em frente e de cabeça erguida, com vocês comigo, sempre.

Agradeço a Sávio, cotidianamente presente não importando que hemisfério deste globo eu esteja. Nosso companheirismo é tão longo e forte quanto minha relação com a micologia. Obrigada pelo carinho, amor e confiança em mim depositadas, pelas ideias, pela compreensão e pelo ombro amigo. Agradeço pela dedicação em nós, pela vida e sonhos que dividimos. De coração, muito obrigada por não deixar a peteca cair! À Maria Joana, Lucy e Amanita, que passaram longas horas ao meu lado e viraram noites me acompanhando durante todas as fases cruciais do doutorado e escrita da tese.

Agradeço a meus amigos Natan, Lucas, Aíla, Vancarder, Leandro, Job, Maeve, Helen, boda Sílvia, Caroline, Altielys, Celeste, Maria Eduarda e João. Com vocês repartí grandes momentos da vida e os meus melhores saltos! Obrigada por terem sido todos ouvidos e pela ajuda perante alguns desesperos, pelas risadas, pelo crescimento pessoal e pela torcida. Vocês sempre me abraçaram, ainda que distantes, com as palavras certas nos momentos mais necessários.

Agradeço às instituições que me receberam, prestaram apoio e cederam estrutura durante o desenvolvimento deste trabalho: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), *Università degli Studi di Cagliari* e *Università degli Studi dell'Aquila*.

Aos docentes do PPGFAP que contribuíram significativamente em minha formação e desenvolvimento da pesquisa, principalmente a Fernanda Cordeiro pelos ensinamentos e discussões anatômicas, e a Mayara Caddah pelo auxílio na identificação das plantas. Agradeço-as também enquanto coordenadoras do PPGFAP, por serem 100% dedicadas, eficientes e nunca deixarem os pepinos burocráticos conturbarem minha trajetória. Estendo meus agradecimentos a todos os profissionais que fazem a UFSC e o PPGFAP acontecerem, em especial Makeli Lusa (PPGFAP/Laveg), Elise Lara (Depart. Botânica), Silvia Venturi (Herbário e Fungário FLOR), William Oliveira (LAMEB), Caio Ragazzi Simão (CIE) e Fábio Frozza (CIE). Obrigada por todo suporte dado nestes últimos 4 anos, especialmente durante os períodos mais graves da pandemia.

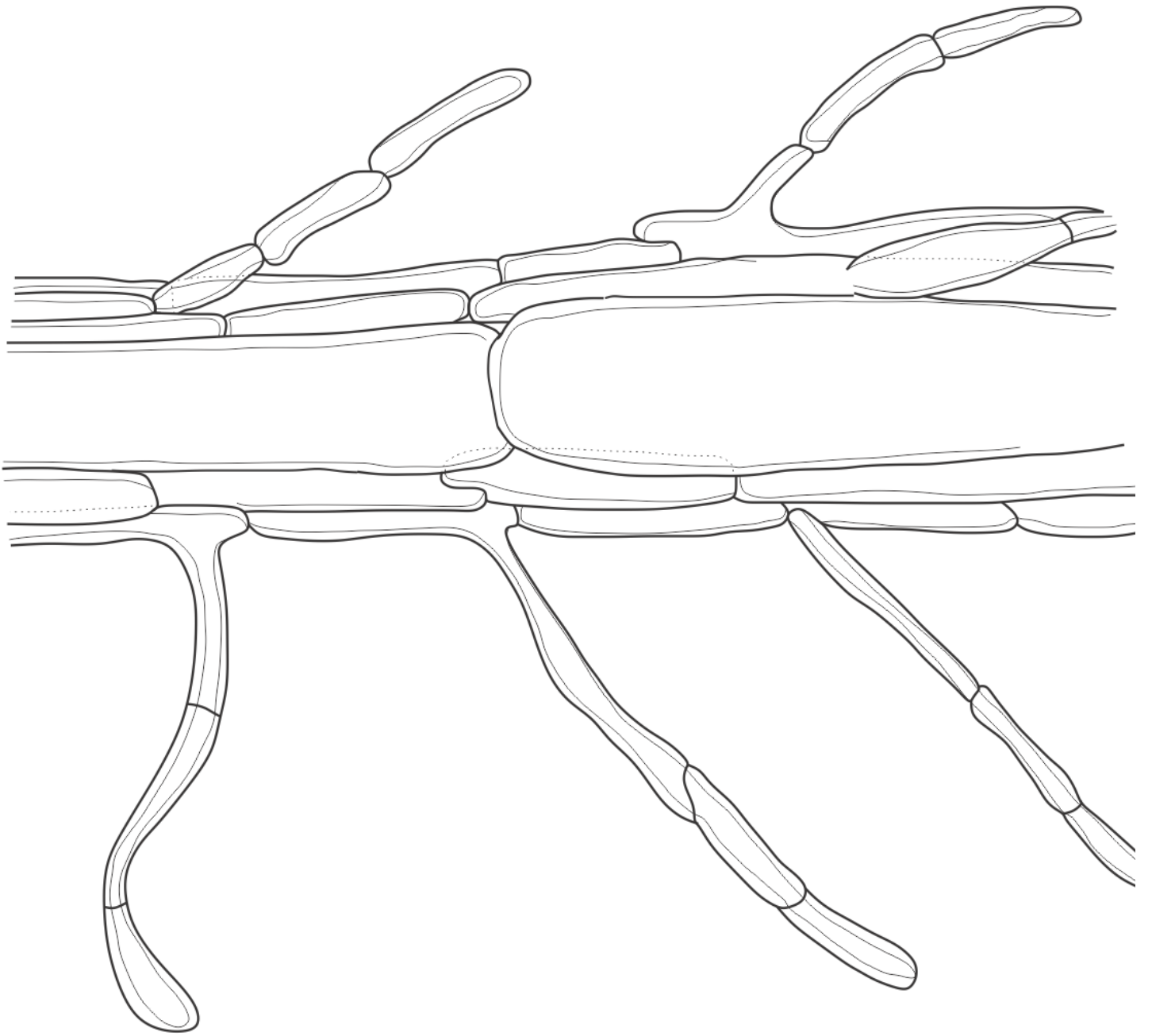
Agradeço à (nossa) primeira turma de doutorado do PPGFAP, Luciana Pereira, Mariana Wagner e Dalzemira Souza. Talvez não pareça muito, mas estar rodeada de mulheres e cientistas tão dedicadas e batalhadoras é sim um grande propulsor na vida e motivo de inspiração. Admiro vocês e torço muito pelo crescimento de cada uma. Agradeço também aos companheiros de choro, Gui Garcia e Ever Richetti. Contem comigo sempre!

Presto também meu agradecimento ao Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina (IMA) e à Fundação Municipal do Meio Ambiente (FLORAM) pelas autorizações de coletas em parques estaduais e do município de Florianópolis/SC.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de doutorado (DS) e de doutorado sanduíche (PDSE) que me permitiu desenvolver parte de minha pesquisa no exterior.

Agradeço à banca examinadora, Dra. Julieta Álvarez-Manjarrez, Dra. Mayara Caddah, Dra. Melanie Roy e Dra. Fernanda Cordeiro por aceitarem o convite para avaliarem esta tese e contribuírem para meu desenvolvimento enquanto pesquisadora. *Merci! ¡Gracias!* Obrigada!

Encerro esta seção fazendo minhas as palavras do rapper Snoop Dogg: *last but not least, I wanna thank me for believing in me, for doing all this hard work, for having no days off, for never quitting, [...] I wanna thank me for tryna do more right than wrong, I wanna thank me for just being me at all times.*





“I doubt a forest can be defined without its fungi” (Stamets 2005).

## RESUMO

A simbiose ectomicorrízica constitui uma das associações mutualísticas mais proeminentes e cruciais ecologicamente, considerando todos os habitats terrestres. A composição de espécies de fungos ectomicorrízicos em um ecossistema afeta diretamente a estrutura da comunidade de plantas. Dada a importância ecológica da seletividade do hospedeiro para as comunidades vegetais e as associações fúngicas, estudos de caráter descritivo, comparativo e filogenético são de particular importância, uma vez que contribuem para uma melhor compreensão dos fatores ambientais que afetam a diversidade de espécies numa escala de tempo. Conhecer os fungos ectomicorrízicos e plantas associadas nos ajuda a compreender os aspectos ecológicos para manutenção das florestas, principalmente de ambientes como a restinga, um ecossistema altamente impactado pelo turismo, exploração imobiliária e mudanças climáticas. Neste trabalho, foram caracterizadas morfo-anatômica e molecularmente ectomicorrizas nativas da Mata Atlântica brasileira. Coletas de raízes e solo foram feitas em três regiões de restinga da Ilha de Santa Catarina. As ectomicorrizas foram morfotipadas e descritas de acordo com critérios estabelecidos na literatura. A região de ITS rDNA do fungo (micorrizas e basidiomas) e da planta (raízes e folhas) foram sequenciadas para identificar ambos os simbiossomas do sistema radicular. Trezentas e cinquenta e quatro raízes com manto ectomicorrízico foram coletadas e 63 morfotipos foram diferenciados. Foram obtidas sequências de ITS de qualidade de dezenove morfotipos, dos quais doze foram caracterizados morfológica e anatomicamente, incluindo *Amanita viscidolutea* e *Austroboletus festivus*, espécies de fungos nativos da restinga. Doze dos morfotipos identificados tiveram associação confirmada com indivíduos de *Guapira opposita* (Nyctaginaceae), enquanto sete morfotipos não tiveram seus simbiossomas vegetais identificados. Membros do clado /tomentella-thelephora foram os mais representativos neste estudo, totalizando onze dos dezenove morfotipos analisados. As ectomicorrizas de *Guapira opposita* não apresentam rede de Hartig assim como não apresentam hifas intraradiculares. Os resultados apresentados neste trabalho confirmam a presença de ectomicorrizas na restinga e sugerem a existência de uma diversidade, acima e abaixo do solo, maior do que a conhecida atualmente. Além disso, os dados gerados corroboram as diferenças morfológicas das ectomicorrizas de Nyctaginaceae observadas no Equador e no México, e endossam a necessidade do estabelecimento de um novo conceito morfológico que englobe as ectomicorrizas neotropicais.

**Palavras-chave:** *Guapira*. Mata Atlântica. Morfologia. Neotrópico. Simbiose.

## ABSTRACT

Ectomycorrhizal symbiosis constitutes one of the most prominent and ecologically crucial mutualistic associations, considering all terrestrial habitats. The species composition of ectomycorrhizal fungi in an ecosystem directly affects the structure of the plant community. Considering the ecological importance of host selectivity for plant communities and fungal associations, descriptive and comparative studies are very important, as they contribute to a better understanding of environmental factors that affect species diversity on a scale of time. Knowing the ectomycorrhizal fungi and the associated plants helps us understand the ecological aspects of maintaining forests, especially in environments such as the restinga, an ecosystem highly impacted by tourism, housing development and climate change. In this work ectomycorrhizae native to the Brazilian Atlantic Forest were morpho-anatomically and molecularly characterized. Root and soil collections were carried out in three restinga areas of Santa Catarina Island. Ectomycorrhizae were morphotyped and described according to criteria established in the literature. The ITS rDNA region of the fungus (mycorrhizas and basidiomata) and the plant (roots and leaves) were sequenced to identify both symbionts of the root system. Three hundred fifty-four roots with ectomycorrhizal mantle were collected and 63 morphotypes were distinguished. ITS sequences were obtained from 19 morphotypes, of which 12 were morphologically and anatomically characterized, including *Amanita viscidolutea* and *Austroboletus festivus*, species of fungi native to the restinga. Twelve of the identified morphotypes had a confirmed association with individuals of *Guapira opposita* (Nyctaginaceae), while 7 morphotypes did not have their plant symbionts identified. Members of the /tomentella-thelephora clade were the most representative in this study, accounting eleven morphotypes. The ectomycorrhizae of *Guapira opposita* do not have a Hartig net as well as they do not have intraradical hyphae. The results presented in this work confirm the presence of ectomycorrhizae in the restinga and suggest the existence of a diversity, above and belowground, greater than what is currently known. Furthermore, the generated data corroborate the morphological differences of Nyctaginaceae ectomycorrhizae observed in Ecuador and Mexico, and endorse the need to establish a new morphological concept that includes Neotropical ectomycorrhizae.

**Keywords:** *Guapira*. Atlantic Forest. Morphology. Neotropic. Symbiosis.

## SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	11
2 INTRODUÇÃO.....	12
2.1 Antecedentes e declaração do problema.....	15
2.2 Descrição e histórico da área de estudo.....	17
2.3 Exposição do problema.....	18
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivos Gerais.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Local de estudo.....	20
4.2 Coleta e triagem do solo.....	21
4.3 Caracterização morfo-anatômica das ectomicorrizas.....	22
4.4 Identificação por similaridade molecular.....	23
5 RESULTADOS.....	25
CAPÍTULO 1 – Morphological and molecular characterization of ectomycorrhizae associated with the roots of <i>Guapira opposita</i> (Nyctaginaceae) in the restinga of southern Brazil.....	33
CAPÍTULO 2 – Morpho-anatomical and molecular characterization of a native mycorrhizae <i>Amanita</i> species associated with <i>Guapira opposita</i> (Nyctaginaceae) in the Brazilian Atlantic Forest.....	61
6 DISCUSSÃO GERAL.....	68
7 CONCLUSÃO.....	71
8 REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICE A – Ilustrações das características dos mantos ectomicorrízicos.....	80
APÊNDICE B – Microscopia Confocal de Varredura a Laser.....	85
APÊNDICE C – Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	86
APÊNDICE D – Morfotipos sem simbionte vegetal determinado.....	87
APÊNDICE E – Morfologia da raiz de <i>Guapira opposita</i> sem e com manto ectomicorrízico.....	89
APÊNDICE F – Microscopia Óptica de Luz.....	91
ANEXOS A – Fixação e inclusão de amostras para microscopia eletrônica de transmissão, modificado de Moore et al. (1991).....	92
ANEXO B – Protocolo de Extração de DNA utilizando DNeasy® Plant Mini Kit.....	93
ANEXO C – Preparo da solução BSA (20mg/mL).....	94
ANEXO D – Protocolo de Purificação de Produto de PCR utilizando PEG.....	96

## 1 APRESENTAÇÃO

Mutualismo ocorre quando dois ou mais organismos trabalham juntos para benefício mútuo, frequentemente para aumentar o sucesso na captação de nutrientes e/ou para prevenir a infecção por parasitas. Muitos organismos, como plantas e formigas, buscam fungos como protetores e vice-versa. Dentre os diversos tipos de interação entre plantas e fungos, as micorrizas merecem destaque. As micorrizas ocorrem em um órgão especializado da planta, onde o contato íntimo com o micélio fúngico resulta no desenvolvimento sincronizado tanto do fungo quanto da planta. Desta forma, plantas também podem se unir umas às outras através de uma rede de hifas que forma uma estrutura incrivelmente complexa e colaborativa conhecida como ‘*Wood Wide Web*’. Nossa atual compreensão do papel dos fungos nos ecossistemas é muito mais avançada do que as visões simplistas sustentadas há algumas décadas. Atualmente é reconhecido que a vitalidade de um ecossistema está diretamente relacionada à presença, abundância e variedade de fungos no ambiente. Mas, quem são estes fungos? Definir uma espécie é um ato complexo, e o debate acerca disto já se arrasta há muitos anos, mas a verdade é que não existe uma definição universal de "espécie" que atenda a um consenso amplo. Uma espécie pode ser definida por sua biologia e como ela se integra de funções ecossistêmicas; uma espécie pode ser definida por seus passos evolutivos e por sua fisiologia; uma espécie pode ser definida por suas particularidades e similitudes morfológicas e anatômicas. Ainda assim, parece ser de percepção comum que estudos de diversidade que se dedicam a investigar morfologicamente uma espécie, sem apresentar resultados diretos de aplicabilidade e potencial bioprospectivo, correspondem a uma pesquisa ultrapassada. No entanto, é importante ter em mente que qualquer pesquisa biológica necessita ser precedida por pesquisas de bases descritivas e criteriosas, ainda mais quando o foco do estudo é uma área ainda inexplorada. O conhecimento acerca de associações ectomicorrízicas no Brasil ainda é ínfimo e superficial, e a diversidade de plantas nativas associadas permanece desconhecida. Abaixo estão destrinchados os primeiros passos para o entendimento da diversidade de ectomicorrizas em áreas de restinga da Mata Atlântica do sul do Brasil, e, acreditando na importância de estudos de base, e por assim dizer *vintage*, o enfoque do presente trabalho foi a caracterização morfo-anatômica detalhada e molecular das ectomicorrizas encontradas nestas áreas.

## 2 INTRODUÇÃO

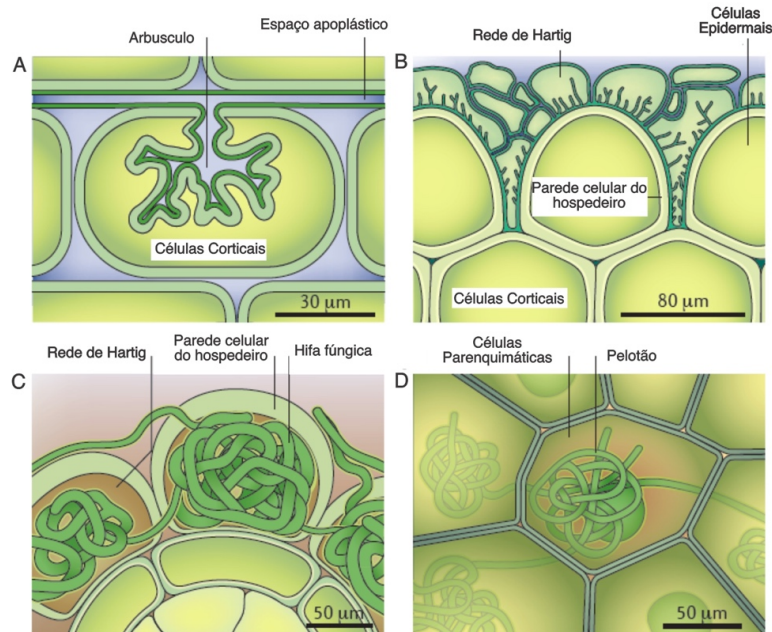
Não é novidade que fungos e plantas também têm um caso de amor. A simbiose micorrízica é uma das formas mais comuns de relações mutualísticas na natureza. Parceiros vegetais e fúngicos interagem de maneira intrínseca na rizosfera, contribuindo em grande proporção para a ciclagem de nutrientes e sequestro de carbono (Smith & Read 2008; Bonfante & Genre 2010). O micélio do fungo associado cresce além das raízes da planta angariando nutrientes e umidade para a planta simbiote, ampliando a zona de absorção bem além da estrutura da raiz. O micélio aumenta drasticamente a ingestão de nutrientes, compostos nitrogenados e elementos essenciais (fósforo, cobre e zinco) pela planta à medida que decompõe os detritos circundantes (van der Heijden et al. 2008). David Perry (1994) postulou que a área de superfície – ou seja, a capacidade de absorção – de fungos micorrízicos pode ser 10 a 100 vezes maior do que a área de superfície foliar em uma floresta. O resultado disto é o crescimento acelerado das plantas parceiras. Os fungos se beneficiam desta relação porque lhes dá acesso a açúcares secretados pelas plantas, principalmente hexoses, que são convertidas em manitóis, arabitóis e eritritóis pelos fungos (van der Heijden et al. 2008).

Dentre tantas funções ecológicas que tanger o universo da micologia, seguramente, uma das mais excitantes é a descoberta das redes miceliais (do inglês *Wood Wide Web*), através das quais as micorrizas interagem e transportam recursos – açúcar, nitrogênio, fósforo – para plantas de diferentes espécies. No entanto, as implicações da ‘*Wood Wide Web*’ excedem essa troca básica de bens entre plantas e fungos. Uma única espécie de fungo seria capaz de conectar quilômetros de uma floresta de forma contínua num sistema complexo através do qual plantas adultas favoreceriam o estabelecimento de plântulas através da transferência direta de carbono (Simard et al. 1997; Simard 2018). O fato de um único fungo micorrízico suportar nutricionalmente pelo menos duas árvores diferentes demonstra que o micélio protege a saúde geral da floresta, mobilizando e alocando multidirecionalmente os nutrientes. Além disso, foi demonstrado também que existe efetivamente uma troca bidirecional de compostos nitrogenados entre plantas através do micélio micorrízico (Arnebrant et al. 1993). Esta rede micelial permite ainda que as plantas enviem avisos umas às outras e estimule, caso necessário, o aumento de respostas defensivas (Zhang et al. 2018). Ainda que a comunicação entre plantas seja possível por meio de hormônios transportados pelo ar, este diálogo torna-se mais eficiente quando enviados via rede micelial (Gilbert & Johnson 2017).

Cerca de 85% das espécies de plantas estão registradas como associadas a fungos micorrízicos (Brundrett & Tedersoo 2018). Alguns pesquisadores propõem que as primeiras

micorrizas, ancestrais do filo Glomeromycota e subfilo Mucoromycotina, tiveram um papel primordial no processo de evolução e conquista do ambiente terrestre pelas plantas há cerca de 410 milhões de anos (Rhodes 2017; Tedersoo et al. 2018). A limitação de macronutrientes no solo levou espécies de árvores a estabelecerem simbioses micorrízicas mutualísticas com clados taxonomicamente diversos de fungos micorrízicos arbusculares, fungos ectomicorrízicos e fungos micorrízicos ericoides (Strullu-Derrien et al. 2018).

Existem sete classes principais de interação simbiótica planta-fungo, entre as quais as classes mais comuns são micorriza arbuscular, ectomicorriza, micorriza orquidoide e micorriza ericoide (Fig. 1). A classificação destas é feita de acordo com o parceiro simbiote e a forma como o micélio fúngico interage com a raiz da planta (Agerer 1986; Martin et al. 2016). Na micorriza arbuscular (Fig. 1A), as hifas fúngicas emanam dos esporos germinados e colonizam as raízes do simbiote ocupando o espaço apoplástico e, em seguida, penetram nas células corticais formando arbúsculos e vesículas intracelulares. Estas estruturas são separadas do citoplasma da célula cortical por uma membrana periarbuscular e uma matriz interfacial, ambos derivados do fungo (Peterson et al. 2004). Já nas ectomicorrizas (Fig. 1B), as hifas se fixam nas células epidérmicas das raízes laterais emergentes no local conhecido como “zona de infecção micorrízica”, onde proliferam e se diferenciam formando dois elementos estruturais: (1) manto de micélio fúngico encobrindo a superfície radicular; (2) rede de Hartig nos espaços intercelulares da camada epidérmica, nas angiospermas, e ao redor das células epidérmicas e do córtex da raiz nas gimnospermas (Peterson et al. 2004; Smith & Read 2008; van der Heijden et al. 2015). A rede de Hartig forma uma interface eficiente para o transporte bidirecional de nutrientes. Embora a maioria das associações ectomicorrízicas compartilhem essas características anatômicas fundamentais, elas podem variar amplamente na importância de suas diferentes estruturas hifais – isto é, o revestimento do manto, rede de Hartig e rede de hifa extramatriciais –, anatomia celular e propriedades fisiológicas (como o intenso transporte bidirecional de metabólitos) (Agerer 1987–2012; Smith & Read 2008).



**Figura 1** – Quatro tipos mais frequentes de interações simbióticas planta-fungo. A. Micorriza arbuscular. B. Ectomicorriza. C. Micorriza ericoide. D. Micorriza orquidoide. Figura adaptada de Peterson e Massicotte (2004), ©Canadian Science Publishing.

Na micorriza ericoide (Fig. 1C), a simbiose é formada entre fungos e plantas da família Ericaceae, na qual as hifas entram em contato com a parede celular epidérmica espessada de raízes muito finas, conhecidas como raízes capilares, penetram por essas paredes e formam complexos de hifas intracelulares nas células epidérmicas. Estes espirais fúngicos intracelulares ficam circundados pela membrana da planta (Peterson et al. 2004). Já as orquídeas (Fig. 1D), mico-heterotróficas em algum estágio durante seu ciclo de vida, formam micorrizas orquidoide com uma variedade de fungos. Na micorriza orquidoide, as hifas fúngicas penetram através das paredes das células vegetais e formam espirais de hifas, chamadas pelotões, dentro de raízes ou caules das orquídeas. Esses complexos são envolvidos por uma membrana derivada da planta e, na interface planta-fungo, uma matriz de polissacarídeo (Peterson et al. 2004).

Frequentemente, as plantas que estabelecem simbiose com fungos micorrízicos arbusculares dominam florestas tropicais quentes e sazonais e ocorrem juntamente a plantas ectomicorrízicas em ecossistemas temperados e subtropicais, nos quais climas sazonalmente quentes e úmidos aumentam a decomposição (Brundrett & Tedersoo 2018). Em contraste a simbiose ectomicorrízica dominaria as florestas temperadas, nas quais climas sazonalmente frios e secos inibem a decomposição da matéria orgânica do solo e é o tipo predominante de



associação mutualística em altas latitudes e elevações. Esta simbiose teria surgido repetidamente de forma independente em várias linhagens de Ascomycota e Basidiomycota, provavelmente a partir de ancestrais saprotroficos ou endotrófico (Shah et al. 2015). Como resultado, as ectomicorrizas consistem em fungos filogeneticamente diversos, que passaram por trajetórias evolutivas e eventos filogeográficos distintos.

## 2.1 Antecedentes e declaração do problema

As pesquisas acerca de micorrizas arbusculares estão bastante avançadas no Brasil, e já têm cerca de 40 anos de história (Siqueira et al. 2010). No entanto, o nosso fascínio pelas interações planta-fungo, nos permitiu focar e investigar associações mutualistas entre fungos ectomicorrízico e raízes de árvores, em habitats naturais da Mata Atlântica brasileira, particularmente na restinga. Plantas ectomicorrízicas são documentadas em cerca de 335 gêneros e 8.500 espécies, com alguns trabalhos recentes que sugerem que uma grande porção de simbiontes vegetais ainda precisa ter seu *status* confirmado, especialmente nos trópicos (Tedersoo & Brundrett 2017). Fungos ectomicorrízicos foram atribuídos a 236 gêneros e cerca de 20.000–25.000 espécies (Comandini et al. 2012), o que é relativamente pouco quando comparado às estimativas atuais que apontam uma diversidade entre 2,2 e 3,8 milhões de espécies de fungos (Hawksworth & Lücking 2017).

Atualmente, existem registros de associação ectomicorrízica com a maioria das plantas de regiões temperadas (Pinaceae, Fagaceae) e algumas famílias de regiões tropicais (Dipterocarpaceae, Fabaceae, Myrtaceae, entre outras) (Brundrett & Tedersoo 2018). Apesar de um viés de amostragem significativo na região Neotropical, Tedersoo e colaboradores (2010a, 2012, 2014) e Brundrett e Tedersoo (2018) mostraram que a simbiose ectomicorrízica é mais comum em regiões temperadas e em florestas tropicais monodominantes. No entanto, a monodominância de algumas plantas é parcialmente explicada pela capacidade das ectomicorrizas de beneficiar principalmente a população de seus simbiontes vegetais e de limitar a acessibilidade do nitrogênio inorgânico a outras plantas (Corrales et al. 2016). Além disso, a maioria das famílias ectomicorrízicas provavelmente emergiu em regiões temperadas e dispersou-se posteriormente nos trópicos (Tedersoo et al. 2014). No entanto, estudos filogenéticos em linhagens ectomicorrízicas generalizadas sugeriram uma origem tropical para algumas linhagens, como Inocybaceae (Matheny et al. 2009), Russulaceae (Alexander 2006) e Clavulinaceae (Kennedy et al. 2012).

Observações ectomicorrízicas estão surgindo em toda a América Latina (Roy et al. 2017; Álvarez-Manjarrez et al. 2017; Corrales et al. 2018; Sulzbacher et al. 2013; Sulzbacher et al. 2019), e uma quebra de paradigma vem sendo observada. Com isso, o interesse pelo estudo de ectomicorrizas nessas áreas tem aumentado e exposto novas percepções sobre a ecologia evolutiva do grupo em regiões neotropicais, o que também amplia os interesses voltados ao potencial econômico e ao impacto que as ectomicorrizas têm nesses ecossistemas florestais (Corrales et al. 2018; Sulzbacher et al. 2019). Espera-se que a maioria das florestas tropicais tenha uma alta diversidade de plantas, com hospedeiros ectomicorrízicos espalhados e associações ectomicorrízicas raras (Peay 2016; Álvarez-Manjarrez et al. 2017). Nestes ecossistemas, poucos estudos foram realizados sobre a ecologia e diversidade de associações ectomicorrízicas (Haug et al. 2005; Tedersoo et al. 2007; Tedersoo et al. 2010b; Álvarez-Manjarrez et al. 2017), e estes poucos registros representam apenas 0,004% das espécies arbóreas neotropicais, e curiosamente, existem vários exemplos de grupos não-monodominantes e lianas associadas a fungos ectomicorrízicos especializados (Tedersoo et al. 2010b), frequentemente dentro de Caryophyllales.

Os fungos ectomicorrízicos brasileiros frequentemente apresentam distribuição fragmentada devido à falta de informação sobre eles e porque nem sempre apresentam a mesma distribuição de plantas hospedeiras (Tedersoo 2007; Tedersoo et al. 2010b). Isso pode resultar em alto endemismo ao nível das espécies devido aos habitats específicos que ocupam (Tedersoo & Smith 2013; Sulzbacher et al. 2013a; Sulzbacher et al. 2013b). Atualmente, existem cerca de 175 espécies de fungos ectomicorrízicos com registro de ocorrência para florestas nativas brasileiras (Roy et al. 2016). Embora Singer e Araújo (1979) tenham mencionado “ectomicorrizas de contato”, os registros que existem são baseados essencialmente em coleções depositadas em herbários, e quase não existe menção a observações de pontas de raízes com ectomicorrizas em habitats naturais, sem confirmação através de uma abordagem genética. De fato, a maioria dos estudos publicados usando amostras ambientais (raízes ou solo) foi feita em plantações de *Pinus* e *Eucalyptus* introduzidos (Giachini et al. 2000; Giachini et al. 2004; Sobestiansky 2005; Sulzbacher et al. 2013b). De maneira geral, na América do Sul, a diversidade de ectomicorrizas associada a plantas nativas da Mata Atlântica ainda permanece desconhecida (Sulzbacher et al. 2013b).

Um dos grandes fatores limitantes para o estudo de ectomicorrizas neotropicais ainda é o número relativamente baixo de especialistas (Roy et al. 2017; Corrales et al. 2018), e, atrelado a isso, existe uma resistência por parte de pesquisadores tradicionalistas em aceitarem que nem sempre é possível aplicar uma definição morfológica padrão para trabalhar com a diversidade

morfológica natural das ectomicorrizas nos mais diversos ecossistemas (Brundrett & Tedersoo 2018). Vanegas-Léon e colaboradores (2019) realizaram um estudo sobre ectomicorrizas em fragmentos de Mata Atlântica na Ilha de Santa Catarina, no qual encontraram evidências morfológica e molecular que comprovam associação entre simbioses que não haviam sido relatados previamente na literatura. Embora sem a conservação de um voucher para estudos comparativos posteriores, esses dados sugerem que o conhecimento e a importância de ectomicorrizas na região neotropical é subestimada.

## **2.2 Descrição e histórico da área de estudo**

A Mata Atlântica é considerada uma das 25 áreas prioritárias de conservação de biodiversidade do mundo (Myers et al. 2000), hospedando diversas espécies endêmicas. A alta diversidade de espécies de plantas potencialmente ectomicorrízicas sugere uma diversidade grande, porém ainda desconhecida, de parceiros ectomicorrízicos (Tedersoo et al. 2010b). Essas relações podem ser generalistas (Pérez-Pazos et al. 2021), no entanto, existem casos de especificidade comprovada, resultantes de um longo processo de evolução conjunta entre plantas e fungos (Pöhlme et al. 2017). Em Santa Catarina, a Mata Atlântica inclui ecossistemas como a restinga, onde pelo menos 600 espécimes de fungos de táxons tipicamente ectomicorrízicos já foram coletados (CRIA 2019).

A devastação da Mata Atlântica brasileira é um dos problemas de conservação mais alarmantes do mundo (Viana et al. 1997), que resulta na eliminação de muitas populações e, potencialmente, na diminuição da diversidade genética de várias espécies (Brown & Brown 1992). Com base na destruição quase total deste bioma e no alto número de espécies endêmicas especialistas, é razoável supor que muitas espécies já se extinguíram antes de serem descritas e que muitas outras logo desaparecerão (Morellato & Haddad 2000). A restinga foi um dos primeiros ambientes a sofrer com a intervenção humana. Atualmente, este ecossistema está presente em 79% da costa brasileira sendo um constituinte essencial da Mata Atlântica. A vegetação de restinga cresce em solos arenosos próximo ao mar e, à medida que se afasta do oceano, é composta por plantas rasteiras, arbustos e árvores, inclusive formando florestas. Além de servir de habitat e refúgio para diversas espécies em pelo menos uma parte de seus ciclos de vida, a restinga funciona como uma região tampão entre o oceano e as florestas, armazenando água das chuvas, auxiliando no controle de inundações e na regulação do ciclo da água (SOS Mata Atlântica 2021). Além disso, a restinga é um ecossistema único e extremo, que exige adaptações específicas e uma alta plasticidade ecológica (Fine et al. 2010). O solo é pobre em

nutrientes devido à rápida lixiviação, e tem alto nível de salinidade devido à proximidade com o oceano (Falkenberg 1999). Todos esses fatores são importantes na estruturação e manutenção da comunidade de fungos ectomicorrízicos, bem como dos simbiossantes vegetais (Corrales et al. 2018).

Devido à prevalência de interação simbiótica na restinga, as ectomicorrizas têm um papel potencialmente crítico nas intervenções de restauração e manejo nesses ecossistemas (Weidlich et al. 2020). As ectomicorrizas podem melhorar a resistência a patógenos na planta hospedeira por competição direta (Barto et al. 2012); elas podem aumentar a tolerância da planta à seca, melhorando a superfície de contato planta-solo, a condutividade de água na planta hospedeira e a resistência à alta salinidade do solo, restringindo a absorção de sódio pelos tecidos da planta e ativando as vias de resposta ao estresse (Pickles & Simard 2017). Como na maioria dos ecossistemas, as comunidades neotropicais dependem de adultos (árvores centrais) para apoiar o crescimento de mudas e manter a diversidade (Simard 2018). Portanto, a restauração ecológica deve se esforçar para melhorar o estabelecimento dessas interações.

### **2.3 Exposição do problema**

A descrição morfo-anatômica das ectomicorrizas tem um valor inerente ao conhecimento de uma espécie (Comandini et al. 2012). A combinação de caracteres morfológicos das ectomicorrizas, e suas características moleculares, integradas com outros dados (por exemplo, metabólitos secundários), contribui para a definição de uma classificação filogenética mais natural do grupo (Comandini et al. 2006). A morfologia e a anatomia ectomicorrízica, além de aumentar o conhecimento dos hábitos ecológicos, tanto do simbiote vegetal quanto da funga, podem ser empregadas para melhorar a resolução filogenética dentro de determinado táxon (Comandini & Rinaldi 2001). Diante das múltiplas abordagens necessárias para a compreensão das ectomicorrizas, existe ainda a necessidade de se estabelecer redes entre pesquisadores da área a fim de suprir as necessidades individuais de cada grupo (Ferlian et al. 2018; Silva-Flores et al. 2021).

Dados preliminares, coletados por mim e demais integrantes do grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Maria Alice Neves, demonstraram que as ectomicorrizas neotropicais encontradas em ambientes de restinga apresentam uma morfologia distinta quando comparada às ectomicorrizas tradicionais e conhecidas em regiões temperadas. Em alguns exemplares coletados, o manto fúngico se estabelece de maneira que as células da epiderme da raiz parecem não existir, assim como não foi identificada a formação e estabelecimento da rede de Hartig e

tampouco de outras estruturas de transferências nos espaços intercelulares. Essa diferença morfológica sugere a possibilidade de que elas funcionem de maneira também diferente, e estudos futuros devem focar em entender esse processo e conferir se há troca de nutrientes entre os organismos envolvidos nessa simbiose. No entanto, para começar a estudar a fisiologia da relação fungo-planta, precisamos conhecer a identidade dos parceiros através de seus padrões morfológicos e moleculares (Ferlian et al. 2018).

Ainda que as ectomicorrizas neotropicais possam constituir um novo tipo de associação planta-fungo, e que difiram da ectomicorriza tradicional, de regiões temperada ou boreal, sabe-se que para descrever uma nova morfologia, as amostras devem ser analisadas sob os mesmos parâmetros e condições metodológicas, para garantir a acurácia dos resultados. Trabalhos interdisciplinares como esse ajudarão a compreender melhor as relações destes fungos, e em uma escala maior, como as ectomicorrizas neotropicais estão relacionadas com as ectomicorrizas de regiões temperadas mais conhecidas. Essas informações nos fornecerão dados não apenas para continuar a explorar a composição dos simbioses ectomicorrízicos, mas também para ir mais longe com os estudos ecofisiológicos em projetos posteriores.

O presente trabalho visa inventariar as ectomicorrizas de restinga em uma área na Ilha de Santa Catarina e contribuir para o conhecimento sobre micorrizas neotropicais. Esse é o primeiro trabalho a explorar a diversidade existente nessa região que busca caracterizar integralmente a morfologia e anatomia da ectomicorriza em conjunto com dados moleculares, bem como destrinchar as interações com plantas nativas da restinga brasileira.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

Visando entender a biodiversidade de ectomicorrizas existente em áreas de restinga brasileira, o presente projeto teve por objetivo investigar as ectomicorrizas coletadas em áreas de restinga da Ilha de Santa Catarina, através de uma abordagem integrativa de dados morfológicos, anatômicos e moleculares.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar morfológica, anatômica e molecularmente ectomicorrizas encontradas em ambientes de restinga;
- Identificar, através de análises moleculares, os componentes vegetais envolvidos nessa simbiose;
- Através de uma análise comparativa entre os táxons mais representativos de ectomicorrizas identificadas em ambientes de restinga e exemplares descritos para outras regiões do mundo, avaliar a necessidade da proposição de um novo conceito morfológico para as ectomicorrizas neotropicais.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local de estudo**

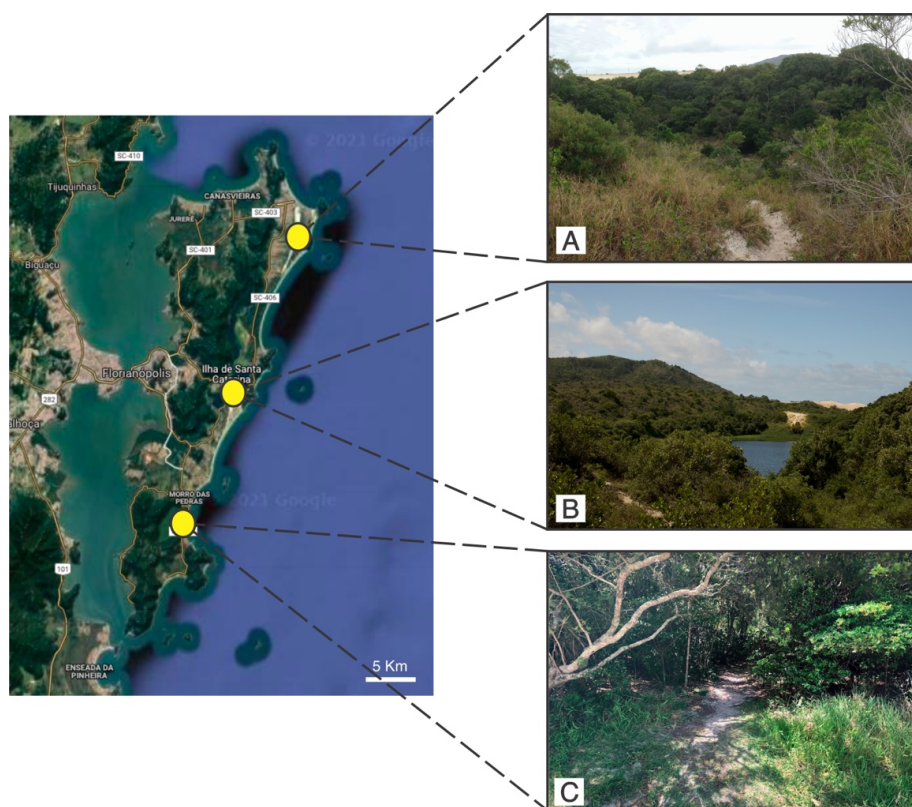
O município de Florianópolis localiza-se no litoral do estado de Santa Catarina, na região sul do Brasil, e tem uma extensão insular de 523 km<sup>2</sup>, conhecida como Ilha de Santa Catarina, e uma área continental de 152 km<sup>2</sup>. Marcada fortemente pelo bioma Mata Atlântica, a vegetação da ilha é composta por três fitofisionomias: manguezal, restinga e floresta ombrófila densa (Woehl et al. 2008). Segundo a classificação de Köppen (Ometto 1981), o clima encontrado na ilha é subtropical, com temperatura média no mês mais frio inferior a 18 °C (mesotérmico) e temperatura média no mês mais quente acima de 22 °C, com verões quentes, geadas pouco frequentes e tendência de concentração das chuvas nos meses de verão (dezembro–fevereiro), sem estação seca definida (Pandolfo et al. 2002).

Um total de vinte e nove expedições a campo foram realizadas entre outubro de 2017 e maio de 2019 em áreas de restinga. As coletas cobriram três áreas inseridas em unidades de conservação (UCs) na Ilha de Santa Catarina: Parque Natural Municipal da Lagoa do Jacaré das Dunas do Santinho (-27.467783, -48.393395) (Fig. 2A), Parque Natural Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição (-27.694028, -48.506587) (Fig. 2B) e Monumento Natural Municipal da Lagoa do Peri (-27.728243, -48.510175) (Fig. 2C). A vegetação destes ambientes está associada a depósitos de areia costeira quaternária e habitats costeiros rochosos (Magnago et al. 2012), crescendo em solo arenoso entre formações lacustres e/ou dunas. A vegetação de restinga apresenta uma importante função nestes ecossistemas pois, atua como um amortecedor

entre o oceano e a floresta. No entanto, tem sido ameaçada pela perda de hábitat e fragmentação ocasionados pela crescente urbanização.

Considerando o estudo florístico publicado por Binfaré e Falkenberg (2017), fizemos uma estimativa das possíveis plantas simbiotas que crescem nessas áreas de restinga, sendo elas membros de Fabaceae, Moraceae, Myrtaceae, Nyctaginaceae, Polygonaceae e Salicaceae.

Para um melhor entendimento das etapas necessárias para realização desta pesquisa, o trabalho foi desenvolvido em três etapas principais: coleta e triagem do solo, caracterização morfológica de micorrizas e sequenciamento de DNA dos morfotipos.



**Figura 2** – Unidades de conservação (UCs) da Ilha de Santa Catarina, Brasil, onde foram realizadas as coletas de solo e raiz do presente estudo. A. Parque Natural Municipal da Lagoa do Jacaré das Dunas do Santinho. B. Parque Natural Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição. C. Monumento Natural Municipal da Lagoa do Peri.

#### 4.2 Coleta e triagem do solo

Em cada área foram coletadas pelo menos quatro amostras de solo seguindo duas abordagens principais: 1) coleta de amostras de solo abaixo de basidiomas de gêneros que apresentavam o status ectomicorrízico conhecido e/ou 2) coleta de solo na proximidade de plantas listadas como possíveis simbiontes. Para a coleta do solo, a camada de serrapilheira foi removida e foram coletados aproximadamente 20 cm<sup>3</sup> em cada ponto. As amostras de solo coletadas foram acondicionadas em sacos hermeticamente fechados para evitar desidratação e levadas ao laboratório onde foram deixadas em água durante a noite. As raízes foram, então, lavadas e cuidadosamente selecionadas sob estereomicroscópio.

As raízes com manto ectomicorrízico foram morfotipadas. Os morfotipos foram fotografados ainda em água, para permitir que tanto hifas quanto filamentos hifais se espalhassem imitando sua posição natural aproximada (Agerer 1991). De cada sistema radicular com manto, várias pontas foram transferidas para álcool 70% e armazenadas a -20 °C para posterior extração de DNA. Além disso, parte do sistema radicular com o manto foi fixado em glutaraldeído 4% para análises morfo-anatômicas (Leonardi et al. 2016).

Espécimes de macrofungos foram coletados utilizando métodos tradicionais em micologia e identificados através da literatura disponível, assim como através do sequenciamento da região ITS (*internal transcribed spacer*) de código de barras do DNA. O status ectomicorrízico foi determinado utilizando os conceitos disponíveis para ectomicorrizas segundo Agerer (1986) e Agerer & Rambold (1987–2012), ou a posição taxonômica de táxons de fungos (Rinaldi et al. 2008; Tedersoo et al. 2010a). Considerando que a morfologia dos basidiomas é bastante conservada, pelo menos em nível de gênero (Singer 1986), e essa característica também é percebida na capacidade de formar micorrizas (Tedersoo et al. 2010a; Tedersoo & Smith 2013), os espécimes coletados e identificados apenas em nível de gênero foram utilizados para fornecer informações sobre distribuição, diversidade e potenciais hospedeiros de fungos ectomicorrízicos. Após realizar as análises macromorfológicas, os espécimes foram desidratados a 40 °C para preservação.

A identificação das plantas foi feita por uma botânica e confirmada pelo sequenciamento de DNA (região ITS) (Caddah, comm. pess.; Cheng et al. 2015). Vouchers dos fungos (micorriza e esporoma) e das plantas foram depositados no herbário e fungário FLOR e no acervo permanente do Laboratório de Micologia (Micolab) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil.

#### **4.3 Caracterização morfo-anatômica das ectomicorrizas**



Escalpos dos mantos micorrízicos fixados em glutaraldeído foram feitos com auxílio de agulhas entomológicas, sob estereomicroscópio Olympus SZ40 Binocular Zoom, e montados em lâminas para observação sob microscópio óptico de luz. Observações e descrições foram feitas utilizando um microscópio Zeiss Axioplan 2 com aumento total de 1000×, na Universidade de Cagliari (UniCa), Itália. Imagens foram capturadas usando uma câmera digital (DFC230, Leica, Wetzlar) acoplada ao microscópio. Ilustrações de características microscópicas das camadas do manto (Apêndice A) foram baseadas em observações ao microscópio óptico de luz.

As análises anatômicas foram realizadas na Universidade de L'Aquila (UnivAq), Itália. Para análises de seções longitudinais (2.5 µm de espessura), as pontas ectomicorrizadas foram inclusas em resina LRWhite (Multilab Supplies, Surrey, UK) (Anexo A), seccionadas com um ultramicrotomo Leica Ultracut R, coradas com azul de toluidina (1%) em borato de sódio (1%) por 10–15 s a 60°C, observadas em um microscópio óptico Zeiss Axioplan 2 e fotografadas com uma câmera digital (LeicaDFC230, Wetzlar, Alemanha). Análises de microscopia confocal de varredura a laser foram realizadas no Centro de Microscopia da UnivAq. Escalpos dos mantos ectomicorrízicos fixados em glutaraldeído foram montados em glicerol e PBS 1× (1:1) e observados com um microscópio confocal TCS SP5 Leica (Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha) acoplado a um microscópio invertido DMI 6000 CS (Objective HCX PL APO óleo CS 40x 1.3) e um laser VIS Argon, com comprimento de onda de excitação do laser fixado em 488 nm. Secções ultrafinas (60–80 nm) foram feitas utilizando uma navalha de diamante, montadas em grades de cobre e contrastadas com UranylLess EM Stain (Electron Microscopy Sciences, Hartfield, Pa, EUA). As secções foram examinadas usando microscópio eletrônico de transmissão (CM100, Philips, Eindhoven) operando a 80 kV e fotografados com câmera digital (PHURONA, Emsis, Münster).

As descrições dos morfotipos seguiram metodologia padrão e terminologias padrão para o estudo das ectomicorrizas (Agerer 1986, 1987–2012, 1991, 1995). Munsell Soil Colour Charts (2000) foram usados como referência para a descrição das cores das ectomicorrizas. As descrições das ectomicorrizas foram baseadas em 6–10 pontas de raízes de cada morfotipo identificado.

#### **4.4 Identificação por similaridade molecular**

A caracterização molecular foi feita no Laboratório Multiusuário de Estudos de Biologia (LAMEB-UFSC), Florianópolis, Brasil. DNA fúngico foi extraído a partir de basidiomas

utilizando o PowerPlant®Pro DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.), seguindo o protocolo do fabricante adaptado para fungos (Anexo B). A região espaçadora interna do DNA ribossomal (nrITS) foi amplificada usando os primers ITS1F e ITS4 (Gardes & Bruns 1993) seguindo os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 55 °C e 1 min a 72 °C; e uma extensão final a 72 °C por 7 min. Uma abordagem de PCR direta foi aplicada para amplificar a região ITS das pontas micorrízicas isoladas das amostras de solo (Iotti & Zambonelli 2006). As pontas micorrizadas foram selecionadas e amplificadas diretamente usando os mesmos pares de primers mencionados anteriormente (ITS1F/ITS4) (Gardes & Bruns 1993). Dois microlitros de solução de BSA (albumina de soro bovino) 20 mg/ml foram adicionados a cada tubo de reação para prevenir a inibição da PCR (Anexo C). Os parâmetros aplicados aos ciclos de PCR seguiram Leonardi et al. (2013).

Para identificar a planta simbiote, o DNA da planta foi extraído das pontas da raiz micorrizada utilizando um kit de isolamento (veja acima), e a região ITS para plantas foi amplificada usando o par de primers ITS-u1 e ITS-u4 (Cheng et al. 2015) seguindo os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min; 34 ciclos de 30 s a 94 °C, 40 s a 55 °C e 1 min a 72 °C; e uma extensão final a 72 °C por 10 min. O DNA das folhas das plantas potencialmente ectomicorrízica foi extraído e utilizado como controle positivo.

Os produtos de PCR foram purificados usando PEG (polietileno glicol, Sambrook Fritsch & Maniatis 1989) (Anexo D). Sequenciamento Sanger foi realizado utilizando o BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, California, USA) na empresa Myleus Biotecnologia, em Minas Gerais, Brasil, seguindo as instruções do fabricante e usando os mesmos primers citados acima para os simbiontes correspondentes. Quando necessário, as sequências geradas e seus respectivos cromatogramas foram editados manualmente no software Geneious R9 (Kearse et al. 2012).

As sequências consenso constituíram nossas unidades taxonômicas operacionais (UTOs), pois 3% é o padrão aceito de variação intraespecífica em estudos de ecologia molecular de ectomicorrizas (Peay et al. 2008). Tais sequências foram registradas no Genbank e os números de acesso são demonstrados na Tabela 1 juntamente as demais sequências usadas para confirmar a identidade das ectomicorrizas. A identidade taxonômica dos morfotipos micorrízicos foi determinada pela afinidade filogenética das sequências consenso ao compará-las com o banco de dado do GenBank e UNITE (Altschul et al. 1990). Ainda que a sequência seja desconhecida, como as de amostras ambientais, esse método fornece uma maneira de definir sua afinidade taxonômica e possíveis laços geográficos, dependendo da disponibilidade de meta-dados no banco de dados usado na pesquisa.

## 5 RESULTADOS

Foram realizadas 29 expedições a campo em áreas de restinga e amostradas 354 raízes colonizadas por um manto micorrízico, entre setembro de 2017 e maio de 2019. Nestas raízes, foram identificados 73 morfotipos distintos. Desse total, 56 foram coletados sob basidiomas referentes a táxons de fungos conhecidos como micorrízicos (Fig. 3), como: *Amanita* Pers., *Austroboletus* (Corner) Wolfe, *Clavulina* J. Schröt., *Gomphus* Pers e *Phaeoclavulina* Brinkmann; e 17 sob plantas pertencentes a famílias cujo status micorrízico já foi registrado em outras regiões (Vasco-Palacio 2016; Vanegas-León 2017; Álvarez-Manjarrez et al. 2017). Foram encontradas raízes com o manto ectomicorrízico tanto em épocas de chuva, como em épocas mais secas do ano. Embora não tenha sido avaliado qualitativamente, uma maior frequência de ectomicorrizas foi amostrada durante a temporada menos chuvosa.

Foram sequenciados 39 morfotipos e obtidas sequências de ITS de qualidade de 19 deles (Tabela 1), dos quais doze foram caracterizados morfológica e anatomicamente. Em decorrência da interrupção das atividades experimentais em laboratório devido à pandemia por COVID-19, apenas quatro dos morfotipos coletados (M36, M36', M41 e M70) receberam o tratamento morfo-anatômico completo envolvendo análises de microscopia eletrônica de confocal (Apêndice B) e de transmissão (Apêndice C). Os morfotipos identificados correspondem às espécies nativas da restinga: *Amanita viscidolutea* (M70), *Austroboletus festivus* (M41), *Tomentella* sp1 (M36) e *Tomentella* sp2 (M36').

Doze dos morfotipos identificados (M30, M32, M34, M36, M36', M41, M50, M51, M53, M57, M68, M70) (Fig. 4; Fig. 1 do capítulo 1) tiveram associação confirmada com indivíduos de *Guapira opposita* (Nyctaginaceae). Para os sete morfotipos restantes (M26, M35, M44, M46, M61, M62, M69 – Apêndice D) não foi possível identificar a planta simbiote.



**Figura 3** – Basidiomas de táxons ectomicorrízicos coletados em áreas de restinga da Ilha de Santa Catarina. A. *Amanita coacta*. B. *Amanita viscidolutea*. C. *Amanita* sp1. D. *Amanita* sp2. E. *Austroboletus festivus*. F. *Clavulina* sp1. G. *Clavulina* sp2. H. *Clavulina* sp3. I. *Clavulina* sp4. J. *Gomphus* sp. K. *Phaeoclavulina zippelii*.

As ectomicorrizas amostradas exibem morfologias bastante diversas, principalmente considerando a coloração e disposição das hifas do manto que cobre a superfície da raiz, das hifas e demais elementos extraradiculares que se espalham no solo, e da densidade de ramificação do sistema ectomicorrízico. Essas características dependem de quais táxons fúngicos estão envolvidos na simbiose. Todas as características listadas acima são usadas para separar morfotipos (Agerer 1991).

Os mantos micorrízicos, em geral, apresentaram sistema de exploração de contato, com alguns morfotipos com sistema de exploração de média distância, apresentando rizomorfos, e outros com sistema de exploração de curta distância.

**Tabela 1** – Identificação dos morfotipos de micorrizas coletados em áreas de restinga da Ilha de Santa Catarina, através de sua similaridade no GenBank.

Voucher	Simbionte	e-value	% Id	GenBank Id	Localidade	Número de acesso
M26	?	1e-178	96.29	Sordariales sp.	Brasil	KT777726
M30	<i>Guapira opposita</i>	0.0	92.73	<i>Tomentella</i> sp.	Porto Rico	JX548271
M32	<i>Guapira opposita</i>	2e-156	99.35	<i>Oidiodendron</i> cf. <i>Maius</i>	Argentina	KC180731
		4e-153	96.40	Leotiomycetes sp.	Nova Zelândia	MN128974
M34	<i>Guapira opposita</i>	0.0	97.85	Uncultured ectomycorrhizal fungus – <i>Tomentella</i>	Equador	FN557576
		0.0	92.75	<i>Tomentella</i> sp.	França/Guadalupe	KF472145
M35	?	0.0	91.90	Uncultured fungus	China	LC622630
		0.0	90.36	<i>Tomentella</i> sp.	-	MW027950
M36	<i>Guapira opposita</i>	0.0	90.25	<i>Tomentella longisterigmata</i>	Finlândia	MG136837
		0.0	91.38	<i>Tomentella</i> sp.	Região do Caribe	KX398760
M36'	<i>Guapira opposita</i>	0.0	91.32	Uncultured fungus	China	LC622630
		0.0	90.52	<i>Tomentella</i> sp.	-	MW027950

Voucher	Simbionte	e-value	% Id	GenBank Id	Localidade	Número de acesso
M41	<i>Guapira opposita</i>	0.0	97.56	<i>Austroboletus festivus</i>	Brasil	KY886203
M44	?	0.0	91.44	Uncultured ECM fungus	região do Caribe	KX398760
		0.0	90.85	Uncultured ECM fungus	Equador	FN557585
M46	?	0.0	91.35	Uncultured ECM fungus	região do Caribe	KX398760
		0.0	90.53	<i>Tomentella</i> sp.	-	MK211703
M50	<i>Guapira opposita</i>	0.0	97.25	Eurotiomycetes sp.	Japão	AB847052
		0.0	97.42	Eurotiales sp.	África do Sul	KT751059
M51	<i>Guapira opposita</i>	0.0	90.20	Uncultured <i>Inocybe</i>	Guiana	JN663843
		2e-174	87.68	<i>Inocybe amazoniensis</i>	Guiana	JN642232
M53	<i>Guapira opposita</i>	0.0	96.71	Uncultured Thelephoraceae	Equador	AY667418
M57	<i>Guapira opposita</i>	2e-157	91.79	Uncultured <i>Tomentella</i> cf. <i>stuposa</i>	Espanha	FJ013054
		1e-154	91.67	Uncultured fungus	Guiana	KT289957
M61	?	0.0	90.36	<i>Tomentella</i> sp.	Montenegro	KY322554
		0.0	90.34	<i>Tomentella stuposa</i>	Escócia	JQ888213
M62	?	0.0	100	<i>Austroboletus festivus</i>	Brasil	KY886203
M68	<i>Guapira opposita</i>	0.0	92.99	Fungal sp.	EUA	MG761298
		0.0	93.40	Uncultured <i>Tomentella</i> sp.	EUA	EU625804

Voucher	Simbionte	e-value	% Id	GenBank Id	Localidade	Número de acesso
M69	?	0.0	95.77	Uncultured ECM Thelephoraceae	Equador	AY667418
		0.0	90.13	Uncultured ECM fungus	Madagascar	FR731230
		0.0	89.98	<i>Tomentella</i> aff. <i>parmastoana</i>	Australia	MT537073
M70	<i>Guapira opposita</i>	0.0	99.37	<i>Amanita</i> sp.	Brasil	MN123998

**Voucher:** código do fungo micorrízico coletado e analisado neste trabalho e seu número de acesso no GenBank.

**Simbionte:** indica a espécie vegetal associada a cada amostra analisada neste trabalho. **e-value:** indica a probabilidade de similaridade na identificação entre as sequências geradas em nosso estudo e as sequências do GenBank. **% Id:** porcentagem de semelhança entre as sequências geradas em nosso estudo e as sequências do GenBank. **GenBank Id:** táxons que apresentaram similaridade com nossas amostras. **Localidade:** país onde foram amostrados os táxons que apresentaram similaridade com nossas amostras. **Número de acesso:** número de acesso no GenBank das sequências mais similares às geradas em nosso estudo.

Todos os fungos sequenciados pertencem a linhagens ectomicorrízicas típicas (Tabela 1) – sendo três referentes a membros de Ascomycota e 16 de Basidiomycota –, com exceção de *Eurotiomycetes* sp. (morfotipo M50) (Fig. 4A) e *Oidiodendron maius* (morfotipo M32) (Fig. 4B) que vêm de linhagens que formam micorrizas ericoides. Como não foram realizadas análises anatômicas detalhadas destes dois morfotipos, eles não foram incluídos em nenhum dos capítulos apresentados nesta tese, então a descrição e discussão destes dados são apresentadas abaixo.

#### Descrições micorrízicas

*Eurotiomycetes* sp. (Fig. 4A)

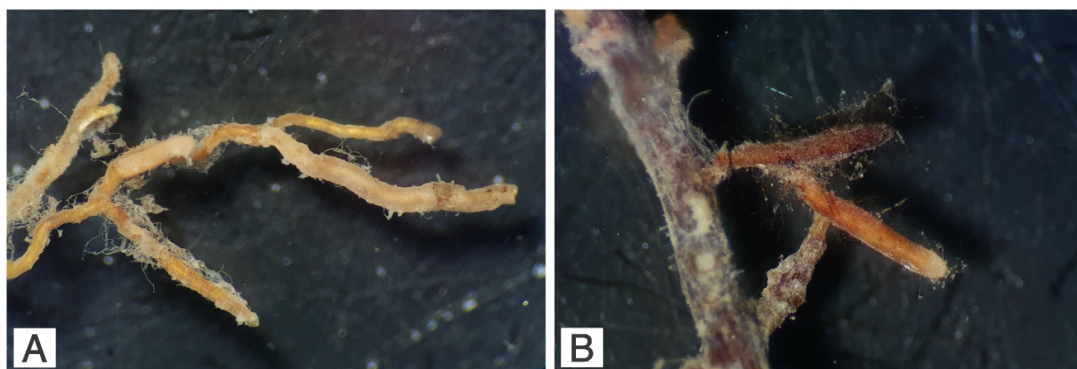
+ *Guapira opposita* (Veill.) Reitz

Voucher: **M50(A)R230**, M50(B)R231, M50(C)R232, M50(D)R233, M50(E)R234, M50(F)R235, M50(G)R238, M50(H)R240, M50(I)R241, M50(J)R242, M50(K)R243

Caracteres morfológicos: Sistema micorrízico simples, às vezes irregularmente pinado, 3,5–4,6 mm de comprimento, sistema de exploração de contato. Eixo principal com 0,15–0,2 mm de diâmetro. Superfície do manto lisa a granulada, tornando-se fibrilosa, marrom escuro (HUE 7,5YR 3/4) ligeiramente brilhante, tornando-se marrom forte (HUE 7,5YR 5/8, 5/6) quando envelhecem. Extremidades não ramificadas curvada, (0,6–) 0,8–2,5 mm de comprimento e 0,18–0,25 mm de diâmetro. Rizomorfos e hifas extraradiculares ausentes. Esclerócios não observados.

Caracteres anatômicos do manto em vistas de superfície: Camada externa do manto vagamente plectenquimatosa, hifas dispostas de forma irregular, nenhum padrão especial discernível, mas hifas geralmente crescendo na direção longitudinal em relação à orientação da raiz. Hifas (2,5–) 3,0–4,0 µm de espessura, hialinas, lisas, de parede fina, bifurcação em forma de Y freqüente; fíbulas ausentes, anastomoses na ponta das hifas. Camada mediana do manto pseudoparenquimatosa, manto com algumas hifas contendo gotículas. Hifas de várias formas, lisas, de parede fina, 3–5 células em um quadrado de 20 × 20 µm. Camada interna do manto plectenquimatosa, com uma matriz gelatinosa entre as hifas. Superfície coberta por gotas de óleo que dificultam a visualização clara do arranjo das hifas. Hifas hialinas, lisas, de paredes finas, algumas cheias de conteúdo homogêneo verde-amarelado, 3,0–5,0 µm de espessura; anastomoses sem fíbulas, geralmente abertas ou fechadas por um septo simples.

Caracteres anatômicos dos elementos emanantes. Rizomorfos e hifas extraradiculares ausentes. Cistídios ausentes.



**Figura 4** – Morfotipos encontrados associados a raiz de *Guapira opposita* na restinga da Ilha de Santa Catarina. A. Eurotiomycetes sp. (morfotipo M50). B. *Oidiiodendron* sp. (morfotipo M32).



*Oidiodendron maius* (Fig. 4B)

+ *Guapira opposita* (Veill.) Reitz

Voucher: **M32(A)R174**, M32(B)R175, M32(C)R176, M32(D)R178, M32(E)R179, M32(F)R185, M32(G)R186, M32(H)R193, M32(I)R194

Caracteres morfológicos: Sistema micorrízico simples, não ramificado, sistema de exploração de curta distância. Eixo principal (1,4–) 2,6–4,7 (–7,4) mm de comprimento e 0,5–1,9 mm de diâmetro, mais estreito na base, extremidades curvadas. Superfície do manto visível, densa, lisa, fibrilosa no envelhecimento, marrom avermelhado (HUE 5YR 4/4) na base, vermelho amarelado (HUE 5YR 5/6) no meio e branco (HUE 5YR 5/1) na ponta. Rizomorfos ausentes. Hifas extraradiculares presentes, mas extremamente raras. Esclerócios não observados.

Caracteres anatômicos do manto em vistas de superfície: Camada externa do manto densamente pseudoparenquimatosa, manto com hifas angulares. Hifas amarelo acastanhado, lisas, de parede fina, ligeiramente glutinosa, 6–8 células em um quadrado de 20 × 20 µm, 12–16 (–18) µm de comprimento, (8,0–) 11–14 µm de diâmetro; fíbulas ausentes. Camada mediana do manto plectenquimatosa e pseudoparenquimatosa, hifas dispostas em estrela e firmemente coladas umas às outras. Hifas de paredes finas, 3,5–4,5 (–6,0) µm de espessura, não se aglutinam como a camada externa. Camada interna do manto pseudoparenquimatosa, manto com algumas hifas contendo gotículas. Hifas de formas variáveis, fortemente aglutinadas, amarelo acastanhado, lisas, de paredes finas, 4–6 células em um quadrado de 20 × 20 µm, 6,5–12 µm de comprimento, 7,0–16 µm de diâmetro; fíbulas ausentes.

Caracteres anatômicos de elementos emanantes. Rizomorfos ausentes. Hifas extraradiculares extremamente raras, cilíndricas, curvadas no ápice, lisas, hialinas, de paredes levemente espessas (0,7 µm de espessura), 2,0–4,0 µm de espessura, secundariamente septadas; fíbuladas, ponta de hifa anastomosando-se com outras hifas (cada uma com uma fíbula). Cistídios presentes, partindo da camada interna, lisa, marrom forte, com paredes espessas (1,5 µm de espessura), 60–110 µm de comprimento, 4,0–5,0 µm de diâmetro, formato de furador, curvado na ponta, às vezes torcido como um saca-rolhas, engrossando na base; fíbulada repetidamente.

Os demais resultados do presente trabalho estão organizados na forma de capítulos:

**Capítulo 1** – Morphological and molecular characterization of ectomycorrhizae associated with the roots of *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) in the restinga of southern Brazil

**Capítulo 2** – Morpho-anatomical and molecular characterization of a native mycorrhizal *Amanita* species associated with *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) in the Brazilian Atlantic Forest

O capítulo 2 foi submetido na forma de artigo para a revista *Mycoscience* (Biodiversidade, Qualis CAPES A4, fator de impacto 1.172) em maio de 2021 e publicado em fevereiro de 2022 (doi: 0.47371/32ycosic.2022.02.001). A revista em questão atende aos pré-requisitos estabelecidos pelo PPGFAP para apresentação da tese de doutorado.

**CAPÍTULO 1 – Morphological and molecular characterization of ectomycorrhizae associated with the roots of *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) in the restinga of southern Brazil**

**Morphological and molecular characterization of ectomycorrhizae associated with the roots of *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) in the restinga of southern Brazil**

Ariadne N. M. Furtado, Ornella Comandini, Marco Leonardi, Andrea C. Rinaldi and Maria Alice Neves

**Abstract**

It is known that the vitality of an ecosystem is directly related to the presence, abundance and variety of fungi in the environment, however the knowledge about ectomycorrhizal associations in Brazil is still dearth, and the diversity of associated native plants remains unknown. In this article, we characterize morpho-anatomically and molecularly the ectomycorrhizae found associated with the roots of *Guapira opposita* in the restinga of southern Brazil. Root and soil collections were carried out in three restinga areas on Santa Catarina Island, Brazil. The ectomycorrhizae found were morphotyped and described according to criteria set out in the literature. Plant and fungi were identified through genetic similarity of their sequences from the ITS region of rDNA. Ten morphotypes were identified, among them the ectomycorrhizae of two native species from the Brazilian restinga: *Amanita viscidolutea* and *Austroboletus festivus*. Representatives of the clade /tomentella-thelephora were the most representative in our study, accounting six species. The generally well-established role of ectomycorrhizae for plant nutrient uptake could be applied to restinga restoration, but we need to develop projects that identify the diversity and better explain the ecology of ectomycorrhizae and their functions so these organisms can be properly used in restinga restoration.

**Key words:** Atlantic Forest; Basidiomycota; Brazilian Funga; diversity; mycorrhizal symbiosis; nurse plant.

**Introduction**

Fungi are said to be those that unite the different organisms of an ecosystem, either literally or functionally (Dighton 2016). Mycorrhizal fungi are spread throughout the fungal tree of life, establishing symbioses with approximately 95% of the plants (van der Heijden et al. 2015). Considering this, we can say that mycorrhizal fungi are an integral part of most terrestrial ecosystems.

Investigations on ectomycorrhizal fungi in native ecosystems in Brazil began in the 1960s with Singer's research in the Amazon (Singer & Morello 1960; Singer et al. 1983). After these, many other studies continue to reveal the diversity of ectomycorrhizal fungi in Brazilian forests (Sulzbacher et al. 2013; Roy et al. 2016; Sulzbacher et al. 2019; Sulzbacher et al. 2020). Still, the relative scarcity of knowledge about ectomycorrhizae and many other belowground interactions increase the need for new research in the neotropics.

It is likely that in neotropical ecosystems, ectomycorrhizae optimize plant fitness and enhance their nutrient acquisition as well as allow the exchange of nutrients and signals between plants through common mycelium network (Lindahl et al. 2015; Huang et al. 2019). This is especially true where there are conditions limiting the decomposition process (Smith & Read 2008), such as the restinga, an important ecosystem that occupy 79% of the coastal Atlantic Forest and has sandy, acidic and nutrient-poor soils, often with high salinity and high irradiance (SOS Mata Atlântica 2021). Several plant species manage to establish and survive in the restinga and ectomycorrhizal fungi may be a key component that allows it (Weidlich et al. 2020).

The existence of restinga environments and mangroves is essential as a buffer between the ocean and the forest, and to shelter many living beings, serving as habitat and refuge for several species in at least one part of their life cycles (Steiner et al. 2015). The restinga also stores rainwater, controls flooding and regulates the water cycle (Lessa et al. 2000). Sadly, anthropic activities are negatively affecting the diversity and functionality of the ectomycorrhizal community in forest soils due to soil erosion, changes in land use, inorganic toxins, fire, and non-native plant invasions (Asmelash et al. 2016). Recently, the Parque Municipal Natural das Dunas da Lagoa da Conceição, one of the largest fragments of restinga in Florianópolis and one of the places where we carried out this study, suffered an environmental disaster caused by the disruption of a water and sewage treatment system that released excess organic matter and a still unknown load of nitrogen and phosphorus in the area, leaving the whole ecosystem out of balance. Soil fungal community regulate several important ecosystem processes, but how this catastrophe affected communities belowground and their function, however, is still unknown.

*Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) is a highly polymorphic species with a wide distribution throughout Brazil. In southern Brazil, the species grows in the Atlantic Forest in several vegetation types, such as restinga (Magnago et al. 2012; Korte et al. 2013). The species can reach 25 m tall but is often shorter when growing in shallow or sandy soils. In restinga, *G. opposita* has leaves that are slightly shorter and more coriaceous than when it grows

in the rainforest. Its fruits are fleshy, dark red to purple, and attract birds that act as dispersers (Reitz 1970). *Guapira opposita* is also a nurse plant (Castanho et al. 2012) contributing to regeneration processes in restinga by increasing the richness and helping to maintain other plant species (Dalotto et al. 2018).

Since the Brazilian restinga constitutes a fragmented ecosystem marked by an intense and accelerated process of deforestation and territorial decrease (SOS Mata Atlântica 2021), we consider very important studies that aim to understand the funga that grows in these areas, especially its belowground dynamics, which are associated with plant hosts that represent a great potential for reforestation and restoration of restinga ecosystems. In this work we present the morpho-anatomical and genetic characterization of ectomycorrhizae formed between *G. opposita* and the belowground funga from a restinga in southern Brazil, presenting unprecedented records about symbiotic associations in the Atlantic Forest.

## **Material and Methods**

### Collecting sites and fungal sampling

Collections were made between October 2017 and May 2019 in three restinga areas in Florianópolis, Brazil: Parque Natural Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição (-27.694028, -48.506587), Monumento Natural Municipal da Lagoa do Peri (-27.728243, -48.510175) and Parque Natural Municipal da Lagoa do Jacaré das Dunas do Santinho (-27.467783, -48.393395). The vegetation in these areas is associated with Quaternary coastal sand deposits and rocky coastal habitats (Magnago et al. 2012) and grows on sandy soil between the ocean and forest. Soil samples (approximately 20 cm<sup>3</sup>) were collected below the basidiomata and left in water overnight. The roots were washed and carefully selected under a stereomicroscope. The roots that had an ectomycorrhizal mantle were morphotyped. From each root system with a mantle, several tips were transferred to 70% alcohol and stored at -20 °C for subsequent DNA extraction. Also, part of the root system with the mantle was fixed in 4% glutaraldehyde for morphological analyses. Voucher material of the basidiomata, ectomycorrhizae and the plant are deposited in the FLOR herbarium and fungarium and the permanent collection of the mycology laboratory (Micolab) at the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil.

The basidiomata that correspond to some of the collected morphotypes were identified by comparing them with the morphology described in the literature (Menolli Jr. et al. 2009;

Magnago & Neves 2014; Wartchow 2020) and by using DNA barcoding of the ITS region. The specimens were collected next to *Guapira opposita* plants. After making morpho-anatomical analyses, the basidiomata were dried at 40 °C for further preservation. The identification of the plant was made by a botanist and confirmed by DNA barcoding (ITS region) (Caddah, pers. comm.; Cheng et al. 2015).

#### Morpho-anatomical analysis of ectomycorrhizae

Mantle preparations of ectomycorrhizae fixed in glutaraldehyde were made under a Leica MZ6 stereomicroscope and fixed on microscope slides for observation under a light optical microscope. Observations and descriptions were made with a Zeiss Axioplan 2 microscope, at 1000 × total magnification, at the University of Cagliari, Italy. Images were taken using a digital camera (DFC230, Leica, Wetzlar) attached to the microscope. Illustrations of microscopic features from the mantle layers were based on observations under the light microscope. The anatomical analyses were conducted at the University of L'Aquila (UnivAq), Italy. For longitudinal section analyses (2.5 µm thick), ectomycorrhizal tips were embedded in LRWhite resin (Multilab Supplies, Surrey, UK), sectioned with a Leica Ultracut R ultramicrotome, stained with toluidine blue (1%) in sodium borate (1%) for 10–15 s at 60 °C, and observed with a Zeiss Axioplan 2 light microscope with a digital camera attached. Confocal laser scanning microscopy was conducted at the Centre for Microscopy. Mantle preparations of ectomycorrhizae fixed in glutaraldehyde were mounted in glycerol and PBS 1× (1:1) and observed with a TCS SP5 Leica confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) coupled to an inverted DMI 6000 CS microscope (Objective HCX PL APO CS 40x 1.3 oil) and a VIS Argon laser, with a laser excitation wavelength fixed at 488 nm. Ultrathin sections (60–80 nm) were made with a diamond knife, mounted on copper grids, and stained with UranylLess EM (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). The sections were examined using a transmission electron microscope (CM100, Philips, Eindhoven) operating at 80 kV and photographed with a digital camera (PHURONA, Emsis, Münster). The morphotype descriptions follow the standard methodology and terminology used for studying ectomycorrhizae (Agerer 1986, 1987–2012, 1991, 1995). Munsell Soil Colour Charts (2000) were used as reference to describe the colors of ectomycorrhizae. The ectomycorrhizal descriptions are based on 6–10 root tips of each morphotype recorded.

#### Molecular and phylogenetic analysis

The molecular characterization of the ectomycorrhiza was done at Laboratório Multiusuário de Estudos de Biologia (LAMEB-UFSC), Florianópolis, Brazil. Genomic DNA was extracted from the basidiomata using a PowerPlant®Pro DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.), following the manufacturer's protocol adapted for fungi. The internal transcribed spacer of ribosomal nuclear DNA (nrITS) region was amplified using the primers ITS1F and ITS4 (Gardes & Bruns 1993) and the following cycling parameters: an initial denaturation at 94 °C for 2 min; 40 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 55 °C and 1 min at 72 °C; and a final extension at 72 °C for 7 min. A direct PCR approach was applied to amplify the ITS region from the ectomycorrhizal tips isolated from soil samples (Iotti & Zambonelli 2006). The ectomycorrhizal tips were selected and directly amplified using the same pair of primers (ITS1F/ITS4) (Gardes & Bruns 1993). Two microliters of 20 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumine) solution was added to each reaction tube to prevent PCR inhibition. The parameters applied to the PCR cycles followed Leonardi et al. (2013).

To identify the plant host, plant DNA was extracted from the ectomycorrhizal root tips using an isolation kit (see above), and the ITS region for the plant was amplified using the ITS-u1 and ITS-u4 primer pair (Cheng et al., 2015) and the following cycle parameters: an initial denaturation at 94 °C for 4 min; 34 cycles of 30 s at 94 °C, 40 s at 55 °C and 1 min at 72 °C; and a final extension at 72 °C for 10 min. The DNA extracted from *G. opposita* leaves was used as a positive control. PCR products were purified using PEG (polyethylene glycol, Sambrook et al. 1989). Sanger sequencing was performed with a BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, California, USA) at the company Myleus Biotecnologia, in Minas Gerais, Brazil, following the manufacturer's instructions and using the same primers cited above for the correspondent symbionts. When needed, the generated sequences and their respective chromatograms were manually edited with Geneious R9 (Kearse et al., 2012).

The consensus sequences were used as OTUs and they were accessed into Genbank. The taxonomic identity of the newly generated sequences from *G. opposita* leaves, basidiomes and the roots with the morphotypes was determined by phylogenetic affinity of the consensus sequences with homologous sequences from Genbank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) using a Blastn search (Altschul et al. 1990). New sequences generated during this work were included in GenBank (Sayers et al. 2009) and the accession numbers for all sequences used are shown in Table 1.

## Results



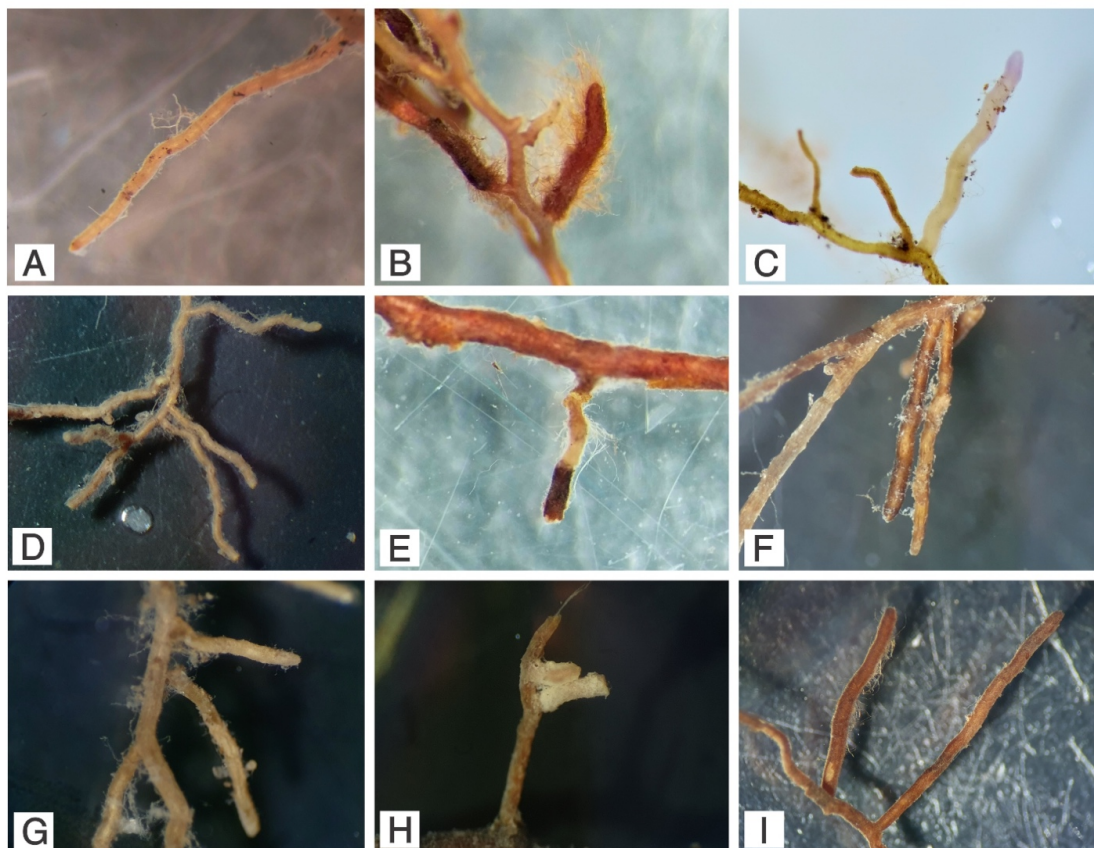
A total of 29 morphotypes were collected from the soil samples (Fig. 1). Ten morphotypes were found associated with *Guapira opposita* roots corresponding to Basidiomycota taxa, based on the barcoding (molecular studies). The most common best represented genus was *Tomentella*, with six species (Table 1). The ectomycorrhizal mantles, in general, presented a contact exploration system, with some morphotypes with a medium-distance exploration system, presenting rhizomorphs, and others with a short-distance exploration system.

Some interesting findings of this work include the collection of *Amanita viscidolutea* and *Austroboletus festivus* basidiomata, two native species from the restinga of the Atlantic Forest.

Table 1 – Identification of ectomycorrhiza morphotypes associated to *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) roots, by their genetic similarity in GenBank

Accession number	Voucher	e-value	% Id	Best BLAST match	Location
	M30	0.0	92.73	<i>Tomentella</i> sp. (JX548271)	Puerto Rico
	M34	0.0	97.85	Uncultured ectomycorrhizal fungus – <i>Tomentella</i> (FN557576)	Ecuador
		0.0	92.75	<i>Tomentella</i> sp. (KF472145)	France/Guadalupe
	M36	0.0	90.25	<i>Tomentella longisterigmata</i> (MG136837)	Finland
		0.0	91.38	<i>Tomentella</i> sp. (KX398760)	Caribbean region
	M36'	0.0	91.32	Uncultured fungus (LC622630)	China
		0.0	90.52	<i>Tomentella</i> sp. (MW027950)	-
	M41	0.0	97.56	<i>Austroboletus festivus</i> (KY886203)	Brazil
	M51	0.0	90.20	Uncultured <i>Inocybe</i> (JN663843)	Guyana
		2e-174	87.68	<i>Inocybe amazoniensis</i> (JN642232)	Guyana

Accession number	Voucher	e-value	% Id	Best BLAST match	Location
	M53	0.0	96.71	Uncultured Thelephoraceae (AY667418)	Ecuador
	M57	2e-157	91.79	Uncultured <i>Tomentella</i> cf. <i>stuposa</i> (FJ013054)	Spain
		1e-154	91.67	Uncultured fungus (KT289957)	Guyana
	M68	0.0	92.99	Fungal sp. (MG761298)	USA
		0.0	93.40	Uncultured <i>Tomentella</i> sp. (EU625804)	USA
	M70	0.0	99.37	<i>Amanita</i> sp. (MN123998)	Brazil



**Figure 1** – Ectomycorrhizal morphotypes associated with *Guapira opposita* roots in the restinga of Santa Catarina Island. A. *Amanita viscidolutea* (morphotype M70). B. *Austroboletus*

*festivus* (morphotype M41). C. *Inocybe* sp. (morphotype M51). D. Thelephoraceae (morphotype M53) E. *Tomentella* sp1. and *Tomentella* sp2. (morphotypes M36 and M36', respectively). F. *Tomentella* sp3. (morphotype M57). G. *Tomentella* sp4. (morphotype M30). H. *Tomentella* sp5. (morphotype M34). I. *Tomentella* sp6. (morphotype M68).

#### Ectomycorrhizal descriptions

##### *Amanita viscidolutea* Menolli, Capelari & Baseia (Fig. 1A)

Morphological characters: Mycorrhizal system not becoming compact with age, mostly scattered. Mycorrhizal system simple, unramified to irregularly pinnate, (1.5–)6.5–12.5(–17.5) mm long, mostly loose and long, fringe exploration system that expands a short to medium distance. Main axis 0.2–0.3 mm in diameter. Mantle surface velvety to slightly cottony, white to yellowish with silver patches (HUE 2.5Y 8/2, 8/4, 8/6) to yellow (HUE 2.5Y 7/8) in older parts. Unramified ends mostly bent, sometimes straight, (1.4–)2.6–4.7(–7.4) mm long and 0.1–0.2 mm in diameter. Hyphal strands present but infrequent, rounded, not ramified, connected to the mantle at a restricted point; white (HUE 2.5Y 8/1), but lighter than mantle surface. Emanating hyphae scarce, thread-like. Sclerotia not observed.

Anatomical characters of mantle in surface views: Outer mantle layer plectenchymatous, loose, composed of ramified and anastomosing hyphae, forming a weak ring-like pattern. Hyphae (2.5–)3–4.5(–5)  $\mu\text{m}$  thick, hyaline, smooth, thin-walled; clampless, with a globular thickening at the septa often present. Hyphae frequently ramified as short, finger-like branches. Middle mantle layer looks like a transition between plectenchymatous and pseudoparenchymatous layers, hyphae crossing in the longitudinal and transverse directions. Inner mantle layer plectenchymatous, more compact than the outer layer. Hyphae hyaline, smooth, thin-walled, some filled with homogeneous yellowish-green content. Hyphae rather irregularly arranged, often growing in longitudinal directions, 3.5–5.5(–6)  $\mu\text{m}$  thick, with at least some hyphal segments of irregular shape and enlarged; clampless.

Anatomical characters of emanating elements. Hyphal strands present, albeit rare, starting from restricted points on the mantle surface, very thin, 16–26  $\mu\text{m}$  thick. Hyphae highly differentiated with vessel-like structures in the center, 6–13(–16)  $\mu\text{m}$  in diameter, walls thick (up to 1  $\mu\text{m}$ ). Outer part of the hyphal strands covered with loosely woven, hyaline, smooth, 2.8–4  $\mu\text{m}$  thick, often slightly thick-walled hyphae (up to 0.5  $\mu\text{m}$ ), hyphal segments often filled with yellow content or with gelatinized walls; clamped. Emanating hyphae sparse, hyaline, 80–

126  $\mu\text{m}$  long, (1.5–)2–2.5  $\mu\text{m}$  in diameter, not ramified, clamps not frequent; cell walls smooth, thin-walled, sometimes filled with homogeneous yellow content; awl-shaped, apical ends slightly acuminate. Cystidia lacking.

Anatomical characters, longitudinal section: Mantle (17–)23–25(–28)  $\mu\text{m}$  thick, hyphae thin-walled, often with three discernible layers: outer layer (in some places weakly developed) 5–10  $\mu\text{m}$  thick, formed by loose hyphae, hyphal cells roundish to elongated, 7.5–10  $\times$  5.0–6.5  $\mu\text{m}$ ; middle layer 7.5–10  $\mu\text{m}$  thick, formed by roundish, 3.5–7.5  $\times$  3.0–5.0  $\mu\text{m}$  hyphal cells, sometimes interweaving with the inner layer; inner layer 7.5–12  $\mu\text{m}$  thick, more compact than the outer layer, hyphae roundish but often elongated, 7.5–17  $\times$  2.5–4.0  $\mu\text{m}$ . Tannin cells not observed. Cortical cells non-differentiated, in 2–3 rows, longitudinally rectangular, (30–)45–62(–67)  $\times$  10–15(–25)  $\mu\text{m}$ , tangentially oriented. Hartig net not present.

Examined materials: BRAZIL. Santa Catarina: Florianópolis, Parque Natural Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, -27.694028, -48.506587, 02 Jun 2019, A.N.M. Furtado (M70'(A)R315, M70'(B)R320, M70'(C)R321, M70'(D)R322, M70'(E)R323, M70'(F)R324, M70'(G)R325, **M70'(H)R326**, M70'(I)R327, M70'(J)R328, M70'(K)R329, M70'(L)R330, M70'(M)R332).

*Austroboletus festivus* (Singer) Wolfe (Fig. 1B)

Morphological characters: Mycorrhizal system simple, unramified, mostly dense and long, short-distance exploration system. Main axis 1.5–4.0(–7.0) mm long and 0.6–0.9 mm in diameter, sometimes tortuous, but mostly straight to bent. Mantle surface grainy to woolly, with some portions stringy, strong brown (HUE 7.5YR 4/6 and 5/8) with yellowish red parts (HUE 5YR 4/6). Older parts dusky red (HUE 10R 3/4). Hyphal strands not observed. Emanating hyphae abundant. Sclerotia not observed.

Anatomical characters of mantle in surface views: Outer mantle layer plectenchymatous, a net of branching hyphae in a regular ring-like arrangement. Hyphae densely incrustated with small crystals, rough, hiding any deeper structure, only some hyphal tips or cystidia-like end-cells visible at the margins. Hyphae (3.5–)4.0–46(–6.5)  $\mu\text{m}$  thick, brownish yellow, hyphal walls slightly thick, less than 1  $\mu\text{m}$  thick; clampless. Hyphae frequently branched, cystidia-like end-cells abundant. Middle mantle layer as a transitional type between plectenchymatous and pseudoparenchymatous, irregularly shaped hyphae from a coarse net, hyphae brownish yellow, 6.0–12  $\mu\text{m}$  thick, thin-walled, cell-walls slightly rough, some crystals, anastomoses mostly with a septum. Inner mantle layer pseudoparenchymatous, hyphae rusty

brown, shape of the hyphae variable, 4–5 cells in a square of  $20 \times 20 \mu\text{m}$ , 7.0–15  $\mu\text{m}$  long, 5.0–6.5  $\mu\text{m}$  in diameter, slightly thick-walled, cell walls often agglutinated, lacking crystals, anastomoses open.

Anatomical characters of emanating elements: Hyphal strands lacking. Emanating hyphae abundant, rusty brown, long, 4.0–5.5 (6.0)  $\mu\text{m}$  in diameter, ramification Y-shaped frequent, clampless; cell walls densely incrustated with small colorless crystals, cell walls up to 1.0 thick; awl-shaped, apical ends simple to bent, walls at the tips thick as remaining walls; diverticulate hyphae frequent. Cystidia like end-cells, clavate to cylindrical, abundant, (10–)12–19(–22)  $\times$  (4.0–)6.0–7.0(–7.8)  $\mu\text{m}$ , slightly thick-walled, colorless to light yellow; cell walls rough, mostly lacking crystals, but less dense and smaller crystal layer can also be found.

Anatomical characters, longitudinal section: Mantle (10–)15–18(–25)  $\mu\text{m}$  thick, at the very tip up to 20  $\mu\text{m}$  thick, plectenchymatous throughout, very compact, no layers discernable; hyphal cells roundish, 5.0–6.0(–7.0)  $\times$  2.0–3.5  $\mu\text{m}$ , slightly thick-walled (up to 1.0  $\mu\text{m}$ ). Tannin cells not observed. Cortical cells non-differentiated, in 2–3(–4) rows, elongated, (40–)50–75(–83)  $\times$  (13–)15–23(–25)  $\mu\text{m}$ , tangentially oriented. Hartig net not present.

Examined material: BRAZIL. Santa Catarina: Florianópolis, Monumento Natural Municipal da Lagoa do Peri, -27.728243, -48.510175, 03 Feb 2019, A.N.M. Furtado (M41(A)R208, M41(B)R209, **M41(C)R210**, M41(D)R211, M41(E)R212, M41(F)R213, M41(G)R214, M41(H)R217, M41(I)R218, M41(J)R220, M41(K)R277, M41(L)R287).

*Inocybe* sp. (Fig. 1C)

Morphological characters: Mycorrhizal system simple, unramified, contact exploration system. Main axis (0.5–)0.7–4.5(–5.5) mm long and 0.1–0.3 mm in diameter, straight, rarely bent. Mantle surface smooth, slightly silver, mostly dense, light-yellow brown (HUE 2.5Y 6/4) to light gray (HUE 5YR 7/1); purplish gray (HUE 10PB 8/4) at the very tip. Older mycorrhizae with a uniform pale-yellow color (HUE 2.5Y 7/4). Hyphal strands absent. Emanating hyphae abundant, not specially distributed. Sclerotia not observed.

Anatomical characters of mantle in surface views: Outer mantle layer plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged, no special pattern discernable, with a gelatinous matrix between the hyphae. Hyphae hyaline, but sometimes membranaceous yellowish, cylindrical, constricted at the septa, abundant oleaginous contents, 4.0–5.0(–7.0)  $\mu\text{m}$  thick, slightly inflated in middle portion, Y-connections frequent, thin-walled, smooth; clampless. Middle mantle layer plectenchymatous as well as the outer layer but hyphae often

growing in longitudinal directions regarding root orientation. Hyphae cylindrical, hyaline, 3.5–4.5  $\mu\text{m}$  thick, thin-walled; clampless. Inner mantle layer plectenchymatous, with a ring-like arrangement of hyphae bundles. Hyphae cylindrical, 3.0–4.0(–6.0)  $\mu\text{m}$  thick, sometimes slightly inflated in middle portion, squarrosely branched, smooth, thin-walled; clampless.

Anatomical characters of emanating elements. Hyphal strands lacking. Emanating hyphae awl-shaped but with bent tips, sometimes curved (sickled-shaped), (–87)94–112  $\mu\text{m}$  long, (–3.0)4.0–5.0  $\mu\text{m}$  thick, membranaceous yellowish brown, smooth, not striking, thin-walled, slightly constricted at the septa, clamped; oleaginous contents covering the surface. Cystidia absent.

Examined materials: BRAZIL. Santa Catarina: Florianópolis, Monumento Natural Municipal da Lagoa do Peri, -27.728243, -48.510175, 04 Feb 2019, A.N.M. Furtado (**M51(A)R230**, M51(B)R232, M51(C)R234, M51(D)R237, M51(E)R240, M51(F)R243, M51(G)R257).

#### Thelephoraceae sp1 (Fig. 1D)

Morphological characters: Mycorrhizal system strongly ramified, irregularly pinnate, 7.0–9.5 mm long, contact exploration system. Main axis 0.15–0.3 mm in diameter. Mantle surface smooth, becoming stringy with age, dark reddish brown (HUE 2.5YR 2.5/4) to dark brown (HUE 7.5YR 3/4) in older parts with silver patches all over the surface. Unramified ends tortuous, beaded in some parts, (2.3–)2.9–4.7 mm long and 0.21–0.27 mm in diameter. Hyphal strands absent. Emanating hyphae present, abundant, slightly cottony, all over the surface but concentrated in the middle portion of the branch. Sclerotia not observed.

Anatomical characters of mantle in surface views: Outer mantle layer plectenchymatous, with a ring-like arrangement of hyphae bundles. Hyphae 5.0–6.5(–8.0)  $\mu\text{m}$  thick, membranaceous brownish yellow, smooth, thick-walled (up to 1.0  $\mu\text{m}$  thick), anastomoses at contact-septum, very agglutinated; clampless. Middle mantle layer as a transition between plectenchymatous and pseudoparenchymatous layers. Hyphae irregularly shaped forming a coarse net, (16–)18–22  $\mu\text{m}$  long, 5.0–7.0  $\mu\text{m}$  in diameter, thin-walled; clampless. Inner mantle layer loosely plectenchymatous, hyphae arranged net-like. Hyphae membranaceous brownish yellow, smooth, thin-walled, (3.0–)4.0–5.5  $\mu\text{m}$  thick, densely agglutinated; clampless.

Anatomical characters of emanating elements. Hyphal strands absent. Emanating hyphae hyaline, ornamented with irregularly shaped crystals (except at the apical end), thin-

walled, 80–126 µm long, (1.5–)2–2.5 µm in diameter, not ramified; clamped, anastomosis with a clamp, bent at the apical end, strongly glutinous. Cystidia lacking.

Examined materials: BRAZIL. Santa Catarina: Florianópolis, Monumento Natural Municipal da Lagoa do Peri, -27.728243, -48.510175, 04 Feb 2019, A.N.M. Furtado (**M53(A)R235**, M53(B)R236, M53(C)R239, M53(D)R243).

*Tomentella* sp1 (Fig. 1E)

Morphological characters: Mycorrhizal system simple, unramified, sometimes with short monopodial pinnate portions, mostly dense, frequently starting from a distinct yellowish-brown mycorrhiza, short-distance exploration system. Main axis 3.2–6.0 mm long and 0.2–0.4 mm in diameter, sometimes tortuous, but mostly bent. Mantle surface mostly reddish black (HUE 10R 2.5/1) to very dusky red (HUE 10R 2.5/2) and dark reddish brown (HUE 5YR 2.5/2) with some darker grains that give the mantle's spongy texture. Unramified ends straight to bent, 0.2–0.3(–1.0) mm long and 0.2–0.3 mm in diameter. Hyphal strands not observed. Emanating hyphae frequent, sparse over the mantle. Sclerotia not observed.

Anatomical characters of mantle in surface views: Outer mantle layer pseudoparenchymatous, composed by angular to epidermoid cells, of various shapes and dimensions. Hyphae reddish brown to yellowish, 5–6 cells in a square of 20 × 20 µm, (9.0–)12–18(–22) µm long, (7.0–)10–15 µm in diameter, slightly thick-walled, smooth, cell walls often agglutinated, aggregating soil particles; clampless. Middle mantle layer very similar to the outer mantle layer but here hyphae are much more branched than in the outer part. Inner mantle layer pseudoparenchymatous, more compact and organized than the outer layer, formed by variable shaped cells, some containing droplets, 4–5 cells in a square of 20 × 20 µm, 7.0–18(–22) µm long, 5.0–10(–13) µm in diameter, brownish, slightly thick-walled.

Anatomical characters of emanating elements. Hyphal strands lacking. Emanating hyphae similar to elongated cystidia, 5.0–6.0 µm in diameter, not ramified, clamped; cell walls smooth, thick-walled, yellowish brown, sometimes filled with homogeneous yellow contents; straight, apical ends simple or inflated, sometimes flattened, walls at tips as thick as remaining walls. Cystidia abundant, bottle-shaped with straight to bent neck, 59–67(–82) µm long, at basis 7.0–10(–12) µm in diameter and 2.0–3.0 µm in diameter apically, smooth, thick-walled, slightly yellow, clamped.

Anatomical characters, longitudinal section: Mantle 35–40(–50) µm thick, hyphae thick-walled, often with two discernible layers: outer layer 22–28 µm thick, formed by densely

arranged hyphae, hyphal cells roundish to different shapes,  $2.5\text{--}6.5 \times 3.5\text{--}6.0 \mu\text{m}$ ; inner layer  $7.5\text{--}12.5(-15) \mu\text{m}$  thick, just as compact as the outer layer, hyphae narrow and longitudinally elongated,  $12\text{--}15 \times 3.7\text{--}6.0 \mu\text{m}$ . Tannin cells not observed. Cortical cells non-differentiated, in 3–4 rows, longitudinally rectangular,  $(50\text{--})55\text{--}70(-82) \times (15\text{--})22\text{--}32(-37) \mu\text{m}$ , tangentially oriented. Hartig net not present.

Examined materials: BRAZIL. Santa Catarina: Florianópolis, Monumento Natural Municipal da Lagoa do Peri, -27.728243, -48.510175, 03 Feb 2019, A.N.M. Furtado (M36(A)R200, **M36(B)R202**, M36(C)R203, M36(D)R204, M36(E)R210, M36(F)R212, M36(G)R215, M36(H)R216, M36(I)R220).

*Tomentella* sp2 (Fig. 1E)

Morphological characters: Mycorrhizal system simple, unramified, often making the connection between a distinct dark brown ectomycorrhiza and the root without the mantle, medium-distance exploration system, smooth subtype. Main axis 14–25 mm long, 0.2–0.5 mm in diameter, straight to slightly curved. Mantle surface frequently stringy, sometimes cottony, olive yellow (HUE 2.5Y 6/6) to olive brown (HUE 2.5 4/3 to 4/4). Hyphal strands present, relatively abundant, sparse, branched, connected in a restricted point to the mantle; pale yellow (HUE 2.5Y 8/3). Emanating hyphae abundant, like hyphal fans. Sclerotia not observed.

Anatomical characters of mantle in surface views: Outer mantle layer pseudoparenchymatous with angular cells bearing a delicate hyphal net of irregularly-shaped angular-triangular or barrel-like cells on surface. Hyphae slightly yellow, 3–4 cells in a square of  $20 \times 20 \mu\text{m}$ ,  $4.5\text{--}5.5(-7.0) \mu\text{m}$  long,  $12\text{--}15 \mu\text{m}$  in diameter, thin-walled, smooth; clampless. Middle mantle layer not clearly observable. Inner mantle layer as a transition type between plectenchymatous and pseudoparenchymatous, compacted, formed by polygonal, elongated or irregular hyphal segments,  $4.0\text{--}6.0 \mu\text{m}$  thick, slightly yellow, thick-walled (up to  $1.0 \mu\text{m}$  thick); clampless.

Anatomical characters of emanating elements. Hyphal strands  $(35\text{--})50\text{--}70(-85) \times 7.0\text{--}8.5(-10) \mu\text{m}$ , with smooth margins; ramification with one or two side branches at nodia. Hyphae slightly differentiated, densely intertwined and aggregated: central hyphae clamped, smooth,  $5.0\text{--}5.5 \mu\text{m}$  in diameter, thick-walled ( $2 \mu\text{m}$  thick), membranaceous yellow; peripheral hyphae clamped, smooth,  $3.0\text{--}4.5 \mu\text{m}$  in diameter, hyphae wall up to  $1.0 \mu\text{m}$  thick, slightly tortuous, loosely woven, repeatedly branched, hyaline. Emanating hyphae similar to elongated cystidia,  $3.0\text{--}5.0 \mu\text{m}$  in diameter, secondarily septate, clamped; ramification Y-shaped below



the clamps; cell walls smooth, slightly thick-walled (up to 0.5  $\mu\text{m}$  thick), hyaline, filled with oil yellow contents; bent, apical ends simple or inflated, sometimes undifferentiated. Cystidia on hyphal strands, rare, fibulocystidium-type, which are elongated, capitate and clamped, 12–17  $\mu\text{m}$  long, at basis 3.0–4.5  $\mu\text{m}$  in diameter and 2.0–2.5  $\mu\text{m}$  apically, smooth, hyphae wall up to 1.0  $\mu\text{m}$  thick, hyaline.

Anatomical characters, longitudinal section: Mantle (25–)32–42(–45)  $\mu\text{m}$  thick, hyphae slightly thick-walled, two hardly discernible layers: outer layer (in some places weakly developed) 17.5–22.5  $\mu\text{m}$  thick, hyphal cells often elongated, (10–)12–18(–20)  $\times$  2.0–3.0 (–4.5)  $\mu\text{m}$ ; inner layer (10–)12.5–15  $\mu\text{m}$  thick, more compact than the outer layer, hyphae of varied shapes, 3.0–4.0(–5.5)  $\mu\text{m}$  thick. Tannin cells not observed. Cortical cells non-differentiated, in 3–4 rows, longitudinally rectangular, (45–)57–125  $\times$  10–12.5(–23)  $\mu\text{m}$ , tangentially oriented. Hartig net not present.

Examined materials: BRAZIL. Santa Catarina: Florianópolis, Monumento Natural Municipal da Lagoa do Peri, -27.728243, -48.510175, 03 Feb 2019, A.N.M. Furtado (M36'(A)R200, **M36'(B)R202**, M36'(C)R203, M36'(D)R204, M36'(E)R210, M36'(F)R212, M36'(G)R215, M36'(H)R216, M36'(I)R220), M44(A)R204.

*Tomentella* sp3 (Fig. 1F)

Morphological characters: Mycorrhizal system irregularly pinnate, dichotomous like, sometimes simples (unramified), 11.5–13 mm long, contact exploration system. Main axis 0.1–0.2 mm in diameter. Mantle surface visible, decaying when older, smooth, loosely grainy becoming stringy with age, yellowish red (HUE 5YR 4/6) becoming dark reddish brown (HUE 2.5YR 2.5/4) aging. Unramified ends straight, (0.6–)1.3–3.0(–5.0) mm long and 0.1–0.2 mm in diameter. Hyphal strands and emanating hyphae absent. Sclerotia not observed.

Anatomical characters of mantle in surface views: Outer mantle layer pseudoparenchymatous, composed of angular cells. Hyphae compact, membranaceous light brown, smooth, thin-walled (up to 0.5  $\mu\text{m}$  thick), 2–4 cells in a square of 20  $\times$  20  $\mu\text{m}$ , 11–15(–17)  $\mu\text{m}$  long, 10–12  $\mu\text{m}$  in diameter; clampless. Middle mantle layer as a transitional type between plectenchymatous and pseudoparenchymatous, irregularly shaped hyphae forming a coarse net, looser than the outer layer. Hyphae smooth, thin-walled, plasmatocal light brown, 11–12.5(–17)  $\mu\text{m}$  long, (6.0–)9.0–11  $\mu\text{m}$  in diameter; clampless. Inner mantle layer plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged, but sometimes arranged net-like. Hyphae hyaline, smooth, thin-walled, 4.0–6.0  $\mu\text{m}$  thick; anastomosing with a clamp.

Anatomical characters of emanating elements. Hyphal strands absent. Emanating hyphae absent, although when old the outer mantle becomes loose from the mycorrhiza surface imitating these structures. Cystidia lacking.

Examined materials: BRAZIL. Santa Catarina: Florianópolis, Parque Natural Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, -27.694028, -48.506587, 04 Feb 2019, A.N.M. Furtado (M57(A)R247, **M57(B)R248**, M57(C)R249, M57(D)R250, M57(E)R252, M57(F)R253, M57(G)R254, M57(H)R255, M57(I)R256, M57(J)R257, M57(K)R258, M57(L)R259, M57(M)R261).

*Tomentella* sp4 (Fig. 1G)

Morphological characters: Mycorrhizal system simple, sometimes irregularly pinnate, 2.5–4.0 mm long, medium distance exploration system, smooth subtype. Main axis 0.1–0.25 mm in diameter. Mantle surface visible, smooth, dense becoming spongy with age, shiny, yellowish brown (HUE 10YR 5/4) to dark yellowish brown (HUE 10YR 4/4) in older parts. Unramified ends mostly straight, (0.4–)1.3–3.7(–4.5) mm long and 0.15–0.25 mm in diameter. Hyphal strands present but infrequent, growing in flat angles, mostly in the proximal and median portions. Emanating hyphae scarce, like subtle hyphal fans, more concentrated in the proximal portion of the mycorrhizal system. Sclerotia not observed.

Anatomical characters of mantle in surface views: Outer mantle layer plectenchymatous, hyphae arranged net-like, sometimes with a weak ring-like pattern and prominent cystidia departing from it. Hyphae 5.0–7.0(–10)  $\mu\text{m}$  thick, yellowish, smooth, thick-walled (1.0  $\mu\text{m}$  thick); clampless. Middle mantle layer as a thin layer, representing a transitional type between plectenchymatous and pseudoparenchymatous systems. Hyphae yellowish brown, smooth, 12–16  $\times$  4.5–7.0  $\mu\text{m}$ , thin-walled. Inner mantle layer denser than the outer layer, pseudoparenchymatous, irregularly shaped hyphae form a coarse net, puzzle-like. Hyphae brownish yellow, thick-walled (1.0  $\mu\text{m}$  thick), 7–9 cells in a square of 20  $\times$  20  $\mu\text{m}$ , 9.6–11(–13)  $\mu\text{m}$  long, 4.0–6.0  $\mu\text{m}$  in diameter; clampless.

Anatomical characters of emanating elements. Hyphal strands present, albeit rare, sparsely distributed, never at the very tip, 20–24  $\mu\text{m}$  thick, becoming tapered towards the apex; reversely oriented ramification, several hyphae grow out of the margin. Very agglutinate sticking soil particles on the surface. Hyphae undifferentiated rather loosely woven of uniform diameter, secondarily septate, thick-walled (1.0  $\mu\text{m}$  thick), membranaceous brownish yellow, irregularly shaped crystals on the surface, 3.0–5.0  $\mu\text{m}$  in diameter; clamped, slightly enlarged

near the septum. Emanating hyphae rare, awl-shaped (bristle-like) with a slightly bent apex, brownish yellow, 119–197(–310)  $\mu\text{m}$  long, 3.0–5.0  $\mu\text{m}$  in diameter, abundant secondary septation, Y-ramifications present, thin-walled ( $<0.5$   $\mu\text{m}$  thick), smooth but agglutinated, holding soils particles on the surface; clamped irregularly, but anastomoses with the septum. Cystidia abundant, fusiform, 37–42(–72)  $\mu\text{m}$  long, at basis 4.0–6.0(–7.0)  $\mu\text{m}$  in diameter and 4.0–5.0  $\mu\text{m}$  apically, smooth, thick-walled (1.0  $\mu\text{m}$  thick), brownish yellow; clampless.

Examined materials: BRAZIL. Santa Catarina: Florianópolis, Monumento Natural Municipal da Lagoa do Peri, -27.728243, -48.510175, 20 Mar 2018, A.N.M. Furtado (M1(R2)R172, **M1(S2)R173**, **M30(A)R173**).

*Toментella* sp5 (Fig. 1H)

Morphological characters: Mycorrhizal system simple, unramified, contact exploration system. Main axis 0.6–1.5 mm long and 0.15–0.2 mm in diameter, bent ends. Mantle surface visible, felty, slightly floury, very pale brown (HUE 10YR 8/4) to brownish yellow (HUE 10YR 6/6) aging. Hyphal strands and emanating hyphae absent. Sclerotia not observed.

Anatomical characters of mantle in surface views: Outer mantle layer plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged, no special pattern discernable, but hyphae often growing in longitudinal directions. Hyphae glutinous, 3.0–4.0  $\mu\text{m}$  thick, slightly yellow, smooth, thin-walled; clampless. Middle mantle layer as a transition between plectenchymatous and pseudoparenchymatous layers, hyphae irregularly shaped forming a coarse net. Hyphae hyaline, thin-walled; clampless. Inner mantle layer plectenchymatous, hyphae arranged hash-like. Hyphae hyaline, strongly glutinous, smooth, thin-walled, 3.5–5.0  $\mu\text{m}$  thick; clampless.

Anatomical characters of emanating elements. Hyphal strands and emanating hyphae absent. Cystidia present, but rare, parting from the inner layer, smooth, strong brown, slightly thick-walled (0.9  $\mu\text{m}$  thick), bottle shaped with a straight neck [(11.5–)13–15  $\mu\text{m}$  long, at basis 4.5–5.5  $\mu\text{m}$  in diameter and 2.5–3.0(–4.5)  $\mu\text{m}$  apically] or flask-shaped [19–23  $\mu\text{m}$  long, 3.0–4.0  $\mu\text{m}$  in a diameter]; clampless.

Examined materials: BRAZIL. Santa Catarina: Florianópolis, Parque Natural Municipal da Lagoa do Jacaré das Dunas do Santinho -27.467783, -48.393395, 08 Nov 2018, A.N.M. Furtado (M34(A)R180, M34(B)R183, M34(C)R185, M34(D)R187, **M34(E)R198**).

*Toментella* sp6 (Fig. 1I)

Morphological characters: Mycorrhizal system monopodial-pinnate, 12.9–14 mm long, contact exploration system. Main axis 0.18–0.27 mm in diameter. Mantle surface visible, densely grainy (warty) to short spiny, shiny and coppery, dark reddish brown (HUE 5YR 2.5/2) to red (HUE 2.5YR 4/8) in older parts. Unramified ends straight with a very few becoming bent, (3.6–)5.0–12.8(–17) mm long and 0.26–0.31 mm in diameter. Hyphal strands absent. Emanating hyphae frequent, branched, yellowish red (HUE YR 5/8). Sclerotia not observed.

Anatomical characters of mantle in surface views: Outer mantle layer pseudoparenchymatous, composed by roundish cells from which emerge cystidia and long emanating hyphae. Hyphae light brown, smooth, thick-walled (1.0  $\mu\text{m}$  thick), 4–6 cells in a square of  $20 \times 20 \mu\text{m}$ , 10–14(–16)  $\mu\text{m}$  long, 9.0–11(–14)  $\mu\text{m}$  in diameter; clampless. Middle mantle layer pseudoparenchymatous, composed of angular hyphae, with great dimensions. Hyphae brownish yellow, smooth, thick-walled (up to 2.0  $\mu\text{m}$  thick), 3–4 cells in a square of  $20 \times 20 \mu\text{m}$ , (19–)23–25  $\mu\text{m}$  long, (15–)17–20  $\mu\text{m}$  in diameter; clampless. Inner mantle layer plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged, no special pattern discernable, but hyphae often growing in longitudinal directions regarding root orientation. Hyphae 3.0–6.0  $\mu\text{m}$  thick, hyaline, smooth, thin-walled, with granular content and a gelatinous matrix between the hyphae; clamped, with Y-ramifications frequent.

Anatomical characters of emanating elements. Hyphal strands absent. Emanating hyphae 4.0–6.0  $\mu\text{m}$  thick, bent in the apex, thick-walled (1.0  $\mu\text{m}$  thick), brownish yellow, secondarily septate; clamped in all septa. Hyphae distributed all over the mantle surface but concentrated in middle and distal portions of the root. Cystidia abundant, of variable shapes, thin-walled (0.5  $\mu\text{m}$  thick); lageniform [17–23(–26)  $\mu\text{m}$  long, at basis (7.0–)9.0–13  $\mu\text{m}$  in diameter and 3.0–4.0  $\mu\text{m}$  apically], globular [13–18  $\times$  10–11  $\mu\text{m}$ ], bottle-shaped with a straight neck [25–36  $\mu\text{m}$  long, at basis 9.0–11  $\mu\text{m}$  in diameter and 3.0–5.0  $\mu\text{m}$  apically] or like a normal hypha but often twisted like a cork-screw [27–33(–40)  $\times$  4.0–6.0] and in this case, clamped.

Examined materials: BRAZIL. Santa Catarina: Florianópolis, Parque Natural Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, -27.694028, -48.506587, 25 Mar 2019, A.N.M. Furtado (M68(A)R291, M68(B)R292).

## Discussion

We report here the occurrence of atypical ectomycorrhizae in the roots of *Guapira opposita*. All the sequenced taxa belong to typical ectomycorrhizal fungal lineages (Table 1) and form

visible ectomycorrhizal morphotypes presenting several layers of hyphae composing a distinguishable mantle.

Some of the ectomycorrhizae we found associated with *Guapira opposita* deserve a special mention and further notes. An incredibly beautiful species present in the restinga areas is *Amanita viscidolutea*. Sequences of the morphotype “M70” showed a great similarity (99.37%) with the Brazilian sequences of *Amanita viscidolutea* basidiomata collected and identified by our research group. The basidiomata of this species range from small to medium, up to 6.0 cm tall. The pileus is flat to depressed, bright yellow with whitish yellow scales. The lamellae are free and white. The stipe is cylindrical, central and with a friable volva (Menolli et al. 2009). The habit is solitary to subgregary, growing on sandy soil on the dunes. This species was originally described for the restinga in the northeast coast of Brazil, in Rio Grande do Norte, but it has been collected in Paraíba and Santa Catarina, and probably grows along the coastal Atlantic Forest. Records based on field observations point out species of the genus *Coccoloba* (Polygonaceae) (Menolli et al. 2009) and a Nyctaginaceae species (Wartchow et al. 2012) as possible symbionts. We recently described the morpho-anatomical features of the ectomycorrhizae formed by *A. viscidolutea* on *G. opposita*, with the help of transmission electronic microscopy. The mycobiont and the host plant were identified from the ectomycorrhizal root tips using molecular tools (Furtado et al. 2022). This was the first description of an *Amanita* ectomycorrhiza on *Guapira*. The features of this ectomycorrhiza — mantle velvety to slightly cottony and whitish yellow with silver patches, a pseudoparenchymatous outer layer and a fringe exploration system that expands a short to medium distance — are similar to those reported for the few described naturally occurring *Amanita* ectomycorrhizae and to other ectomycorrhizae formed with members of Nyctaginaceae (Furtado et al. 2022).

Another interesting species recorded in our site collection was *Austroboletus festivus*. Sequences from the ectomycorrhizal root tips (morphotype “M41”) showed 97.56% of similarity with Brazilian sequences of *A. festivus* basidiomata collected and identified by our research group. The taxon corresponds to a boletoid species, which type specimen was collected in northeastern Brazil, in Pernambuco (Singer 1970). In addition to the type specimen, the species was also recorded in Paraná and Santa Catarina (Magnago et al. 2014). *Austroboletus festivus* is easily recognized in the field as it has small to medium basidiomata, a densely fibrillose pileus with brownish-red fibrils on a pink surface. The stipe is white with a pink basal mycelium, and the stipe context oxidizes when cut, changing color to red and greenish blue when exposed, therefore the epithet ‘festivus’. Just like Agerer (1995) interestingly pointed out

it is possible to find a structural correspondence between the hyphal constituents of the basidiomata of the mushroom, in this case *A. festivus*, and its ectomycorrhiza. Like the basidioma, the ectomycorrhiza is formed by clampless hyphae densely encrusted with small crystals, immersed in a glutinous matrix. In addition, the presence of two types of cystidia, clavate and filamentous, also with small crystals, occurs both in the poroid hymenophore and on the external surface of the mantle of the ectomycorrhiza. Currently, and as contribution from our work about the ectomycorrhizae from the restinga, *Austroboletus festivus* and *Amanita viscidolutea* were considered in The IUCN Red List of Threatened Species and accessed in the vulnerable category according to IUCN criteria (Neves & Furtado 2020a; Neves et al. 2020b). This is the first morpho-anatomical and molecular characterization of a native *Austroboletus* ectomycorrhiza with a native plant host from restinga in the Atlantic Forest.

Ectomycorrhizae of an unknown species of *Inocybe* were collected during our research. However, there are almost no voucher sequences with similarity greater than 90% in Genbank. A similar ectomycorrhiza has been found associated with *Dicymbe corimbosa* in Guyana and it presents 90.20% of similarity with morphotype “M51” sequences. Although the genus encompasses ca. of 750 species distributed throughout the world (Matheny et al. 2020), the taxon is undersampled in Brazil. There are only seven species known for Brazilian forests: *I. austrolilacina* Wartchow & RM Silveira, *I. cavalcantiae* Wartchow, *I. curvipes* P. Karst., *I. hyperhytra* Rick, *I. lepidospira* Wartchow, *I. martinica* Pegler and *I. violaceolamellata* Rick (Wartchow 2018, 2020). Nonetheless, none of these works address the mycorrhizal potential of the taxa or have confirmation of the plant symbiont, even though they pointed out as potential partners members of Nyctaginaceae, Euphorbiaceae and Fabaceae subfam. Caesalpinoideae. The color of the mantle of *Inocybe* ectomycorrhizae has been used to distinguish morphotypes of the genus, and anatomical features can be used to refine this sorting (Seress et al. 2015). Based on the morpho-anatomical characterization of the *Inocybe* ectomycorrhiza described here in comparison to the seventeen descriptions previously published (Seress et al. 2015; Deemy website <http://www.deemy.de/>), we could differentiate the ectomycorrhiza from our study mainly due to two characters: presence of a contact exploration system, as opposed to a short-distance system frequent in other species of the genus; and the color of the tip that is distinctly purple (Fig. 1C) in contrast to the white tip found in all other *Inocybe* ectomycorrhizae previously described.

Representatives of /tomentella-thelephora clade were by far the most representative taxa in our study (M30, M34, M36, M36', M53, M57 and M68 morphotypes), as expected and reported in previous studies (Tedersoo et al. 2014). Studies based on root and soil analysis often

find that the /tomentella–thelephora clade is diverse and dominant in neotropical habitats, but usually they are undersampled due to their inconspicuous basidiomata (Kõljalg et al. 2001; Tedersoo et al. 2014; Álvarez-Manjarrez et al. 2016), making it difficult to identify the sampled taxon. Unlike what has been reported in previous works (Haug et al. 2005; Álvarez-Manjarrez et al. 2017), the *Tomentella* ectomycorrhizae sampled in our work more often form morphotypes with a contact exploration system, or even with a medium distance exploration system with a smooth subtype.

Among the various *Tomentella* species found during this survey and linked to *Guapira opposita*, *Tomentella* sp1 (morphotype M36) and *Tomentella* sp2 (morphotype M36') were the most interesting. These taxa, frequent in our plots, appeared to grow on the same root segment. The morphotype M36' was always observed in the most proximal portion of the main root while morphotype M36 was more distal to the main root. Even though we do not have information about the biology of these species, there is possibly a functional codependency between them, that could be explained if their growth and development could be monitored. Sequences of *Tomentella* sp1 have 91.38% similarity with a *Tomentella* ectomycorrhiza isolated from the root of *Coccoloba uvifera* from the Caribbean region, and have 90.25% similarity with basidiomata sequences of *Tomentella longisterigmata* from coniferous forests from Finland. *Tomentella* sp2 have 91.32% similarity with an ectomycorrhiza associated with *Pinus tabuliformis* from China (Lu et al. 2018), and 90.52% similarity to a species of the genus associated with *Quercus pubescens* (Mrak et al. 2021).

Two of the /tomentella-thelephora ectomycorrhizae presented high similarity with samples from Ecuador. The morphotype M34 presented 96.71% similarity with the sequence of an ectomycorrhiza isolated from the roots of *Neea* sp. (Haug et al. 2005). There are records of *Guapira* and *Neea* species forming ectomycorrhiza with only one fungal taxon member of Thelephoraceae, where it would be possible to observe a fine long root system of only long roots, with an incomplete hyphal mantle development and with no suppression of the root hairs formation (Moyersoen 1993; Haug et al. 2005). The same was not observed in our survey. *Guapira opposita* was associated with at least four different fungal species, including taxa from phylogenetically distant orders (eg. *Austroboletus festivus* – M41- sharing the same root system with *Tomentella* sp1 – M36, and *Tomentella* sp2 – M36'). Also, even though *G. opposita* presents a fine root system composed by long roots, there was a complete formation of the ectomycorrhizal mantle over the root, as well as the suppression of the root hairs formation. The morphotype M53 showed 97.85% similarity with an ectomycorrhiza isolated from the

*Coccoloba gigante* roots (Polygonaceae) also from Ecuador (Tedersoo et al. 2010). Unfortunately, there are no morphological or anatomical data to be compared to our data.

The morphotype M30 matches in 92.73% with a *Tomentella* sp. ectomycorrhiza isolated from the roots of *Pisonia taina* from Puerto Rico (Hayward & Horton 2014), but there are no voucher sequences with similarity greater than 90% in Genbank, as well as for most telephoroid fungi samples from our study. The morphotype M57 is 91.79% similar to *Tomentella stuposa* associated to *Pinus pinaster* roots, from Spain, but when the morpho-anatomical characteristics are compared, the species do not match (Jakucs et al. 2005). They both have a similar general organization of the mantle layers; however, the arrangement of the hyphae differs (it is a star-like structure in *T. stuposa* morphotype and a net-like arrangement in M57 morphotype). Furthermore, the morphotype of *Tomentella stuposa* has emanating elements and hyphal strands, features that are absent in the M57 morphotype. These are some of the characters that allow us to consider them as ectomycorrhizae from distinct species. An interesting particularity of the morphotype M57 is that even though it often occupies the entire root system, it is possible to find other morphotypes starting from it, such as M51 (*Inocybe* sp.) and M53 (Thelephoraceae sp.) morphotypes. The highest percentage of similarity for M68 morphotype (93.40%) observed was with an ectomycorrhiza of *Tomentella* sp. isolated from the rhizome of *Corallorhiza odontorhiza* orchid (McCormick et al. 2009). Although orchids are often found forming endomycorrhizal associations with the genus *Rhizoctonia*, the ectomycorrhizal association with taxa of Thelephoraceae has also been recorded (Bidartondo & Read 2008; Roy et al. 2013).

Despite these genera being widely known to be ectomycorrhizal and usually having typical anatomical structures (mantle, Hartig net and extraradicular hyphae), the ectomycorrhizae of *Amanita viscidolutea*, *Austroboletus festivus*, *Tomentella* sp1 and *Tomentella* sp2 do not form a Hartig net. It is possible that the lack of the Hartig net is common among other taxa that grow in restinga, if not in all of them. The results of the anatomical analyzes of their ectomycorrhizal systems revealed close connections between the layered ectomycorrhizal mantle and the cortical root cells. However, no intercellular or intracellular fungal penetration was observed in the root cortex. Additionally, the epidermal cells of the root of *Guapira opposita*, where the mantle is established, are absent. Although we understand it's not a taxonomic character for either the plant or the fungus, we are still working to understand if the absence of the epidemical layer on the root could be some evolutionary step of the symbiosis for the establishment of the association or even physiological responses of the plant to the fungal colonization.



The results presented here strengthen data generated in other studies for neotropical ecosystems. Together, they endorse the existence of morpho-anatomical particularities of tropical ectomycorrhizae. Álvarez-Manjarrez et al. (2021) proposed the incipient ectomycorrhizae concept to include the “stranger things” found in the tropics. There is still the need to propose a new name that includes ectomycorrhizae with atypical morphology.

Overall, this evidence points out to the importance of Caryophyllales as ectomycorrhizal hosts in Neotropical ecosystems and the need to study ectomycorrhizal associations and the role of the symbiosis in the neotropics (Roy et al. 2016).

## **Conclusion**

We are just starting to understand the biological and functional complexity of the ectomycorrhizal associations with *Guapira opposita*. We aim to better understand how *G. opposita* acts as a nurse plant, how it is affected by its fungal partners and how the mycelial network shared with neighboring host plants works, considering its importance in restinga environments. Now we know that *G. opposita* forms ectomycorrhizae with at least ten species of ectomycorrhizal fungi in the restinga in southern Brazil. The apparent generalist status of *G. opposita* is probably due to its role as a nurse plant, but studies on mycorrhizal status and identification of mycobionts are needed to draw conclusions about mycorrhizae evolution and potential host specificity in this and other Nyctaginaceae.

The collection of basidiomata of *Tomentella* and other Thelephoraceae continues to be a great challenge for those who study the species in Thelephoraceae. We were not successful in finding *Tomentella* basidiomata to check their correspondence with the species found associated with *Guapira opposita* root system. *Tomentella* species often have inconspicuous basidiomata and in general are formed in the soil, or on rotten wood, and require ideal environmental conditions to produce the basidiomata. Restinga is an extreme ecosystem that undergoes constant disturbances, anthropogenic or biotic, factors that can also affect the production of basidiomata.

The species presented here can be thought of as a starting point to develop and establish plans for reforestation and management of the restinga along the coast, using both native plants and fungi. The increase in the plant survival rate in the field would be directly related to the fact that both symbionts would be adapted to local conditions. However, it would be important to have more knowledge about the biology, physiology and ecology of the ectomycorrhizal community, as well as to isolate strains and develop techniques to produce fungal inocula,

which has proven to be a great challenge, since many ectomycorrhizal species do not easily grow on culture.

This work can be considered a time frame for future studies, as mentioned earlier. The study area suffered an environmental disaster that may have promoted irreversible disruption of the ecological communities that structure the restinga ecosystem. The restinga needs to be protected and included in the coastal city planning as preserved natural areas. Threats to biodiversity destruction in tropical and neotropical ecosystems should encourage fast inventories of the diversity and function of mycorrhizae in tropical latitudes that are biodiversity hotspots. Thus, the results presented here can be used as parameters for future studies that seek to assess the impact of this event on the dynamics of communities that occupy these areas.

## References

- Agerer R. (1986) Studies on ectomycorrhizae II. Introducing remarks on characterization and identification. *Mycotaxon*, 26, 473–492.
- Agerer R. (1987–2012) *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. 15 parts. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd.
- Agerer R. (1991) Characterization of ectomycorrhiza. In: Norris J. R., Read D. J., & Varma A. K. (eds) *Methods in Microbiology*. Vol. 23. *Techniques for the Study of Mycorrhiza*. Academic Press, San Diego, pp 25–73.
- Agerer R. (1995) Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizae: an attempt towards a natural classification. In: Varma A., & Hock, B. (eds) *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, pp 685–734.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myer E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410.
- Álvarez-Majarez J., Garibay-Orijel R., Smith M.E. (2017) Caryophyllales are the main hosts of a unique set of ectomycorrhizal fungi in a Neotropical dry forest. *Mycorrhiza*, 28, 103–115.
- Asmelash F., Bekele T., Birhane E. (2016) The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi in the restoration of degraded lands. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1095. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01095
- Bidartondo M.I., Read D.J. (2008). Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology*, 17, 3707–3716. Doi: 10.1111/j. 1365-294X.2008.03848.x
- Castanho C.T., Oliveira A.A., Prado P.I. (2012) The importance of plant life form on spatial associations along a subtropical coastal dune gradient. *Journal of Vegetation Science*, 23, 952–961.

- Cheng T., Xu C., Lei L., Li C., Zhang L., Zhou S. (2015) Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, 16, 138–149.
- Dalotto C.E.S., Sühs R.B., Dechoum M.S., Pugnaire F.I., Peroni N., Castellani T.T. (2018) Facilitation influences patterns of perennial species abundance and richness in a subtropical dune system. *AoB PLANTS*, 10, ply017.
- Dighton J. (2016) *Fungi in ecosystem processes*. New York, CRC Press.
- Furtado A.N.M., Comandini O., Leonardi M., Rinaldi A.C., Neves M.A. (2022) Morpho-anatomical and molecular characterization of a native mycorrhizal *Amanita* species associated with *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) in Brazilian Atlantic Forest. *Mycoscience*, 63. Doi: 10.47371/57ycosic.2022.02.001.
- Gardes M., Bruns T.D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113–118.
- Haug I., Weiss M., Homeier J., Oberwinkler F., Kottke I. (2005) Russulaceae and Thelephoraceae form ectomycorrhizas with members of the Nyctaginaceae (Caryophyllales) in the tropical mountain rain forest of southern Ecuador. *New Phytologist*, 165, 923–936.
- Hayward J., Horton T. (2014) Phylogenetic trait conservation in the partner choice of a group of ectomycorrhizal trees. *Molecular Ecology*, 23, 4886–4898.
- Huang A.C., Jiang T., Liu Y.-X., Bai Y.C., Reed J., Qu B., Goossens A., Nützmann H.W., Bai Y., Osbourn A. (2019) A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota. *Science*, 364, eaau6389
- Iotti M., Zambonelli A. (2006) A quick and precise technique for identifying ectomycorrhizae by PCR. *Mycological Research*, 110, 60–65.
- Jakucs E., Kovács G.M., Agerer R., Romsics C., Erős-Honti Z. (2005) Morphological-anatomical characterization and molecular identification of *Tomentella stuposa* ectomycorrhizae and related anatomotypes. *Mycorrhiza*, 15, 247–258.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P., Drummond A. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647–1649.
- Korte A., Gasper A.L., Kruger A., Sevegnani L. (2013) Composição florística e estrutura das restingas em Santa Catarina. In: Vibrans, A. C., Sevegnani, L., Gasper, A. L., et al. (eds.). *Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina, Vol. IV, Floresta Ombrófila Densa*. Blumenau. Edifurb.
- Kõljalg U., Jakucs E., Boka K., Agerer R. (2001) Three ectomycorrhizae with cystidia formed by different *Tomentella* species as revealed by rDNA-ITS sequences and anatomical characteristics. *Folia Cryptogamica Estonica*, 38, 27–39.

- Leonardi M., Iotti M., Oddis M., Lalli G., Pacioni G., Leonardi P., Maccherini S., Perini C., Salerni E., Zambonelli A. (2013) Assessment of ectomycorrhizal fungal communities in the natural habitats of *Tuber magnatum* (Ascomycota, Pezizales). *Mycorrhiza*, 23, 349–358.
- Lessa G.C., Angulo R.J., Giannini P.C., Araújo A.D. (2000) Stratigraphy and Holocene evolution of a regressive barrier in south Brazil. *Marine Geology*, 165, 87–108.
- Lindahl B.D., Tunlid A. (2015) Ectomycorrhizal fungi—potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytologist*, 205, 1443–47.
- Lu X., Steffen K., Yuan H-S. (2018) Morphological and molecular identification of three new species of *Tomentella* from Finland. *Mycologia*, doi: 10.1080/00275514.2018.1474683
- Magnago A.C., Neves M.A. (2014) New record of *Austroboletus festivus* (Boletaceae) from Santa Catarina, Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, doi: 10.1007/s40415-014-0048-3
- Magnago L.F.S., Martins S.V., Schaefer C.E.G.R., Neri A.V. (2012) Restinga forests of the Brazilian coast: richness and abundance of tree species on different soils. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 84, 807–822.
- Matheny P.B., Hobbs A.M., Esteve-Raventós F. (2020) Genera of Inocybaceae: new skin for the old ceremony. *Mycologia*, 112, 83–120.
- Menolli Jr. N., Capelari M., Baseia I.G. (2009) *Amanita viscidolutea*, a new species from Brazil with a key to Central and South American species of *Amanita* section *Amanita*. *Mycologia*, 101, 395–400.
- Moyersoen B. (1993) Ectomicorrizas y micorrizas vesículo-arbusculares en Caatinga Amazónica del Sur de Venezuela. *Scientia Guaianae*, 3.
- Mrak T., Šibanc N., Brailey-Jones P., Štraus I., Gricar J., Kraigher H. (2021) Extramatricial mycelium and ectomycorrhizal community composition of *Quercus pubescens* in a sub-Mediterranean stress-prone environment. *Frontiers in Forest and Global Changes*, 4, 599946, doi: 10.3389/ffgc.2021.599946
- Neves M.A., Furtado A.N.M. (2020a) *Amanita viscidolutea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020, <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T172740193A172861167.en>
- Neves M.A., Furtado A.N.M., Cardoso J.S. (2020b) *Austroboletus festivus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020, <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T172740512A172861192.en>
- Reitz R. (1970) Nyctaginaceae. *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues.
- Roy M., Gonneau C., Rocheteau A., Berveiller D., Thomas J.C., Damesin C., Selosse M-A. (2013). Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and

achlorophyllous orchid individuals in situ. *Ecological Monographs*, 83, 95–117. Doi: 10.1890/11-2120.1

Roy M., Schimann H., Braga-Neto R., da Silva R.A.E., Duque J., Frame D., Wartchow F., Neves M.A. (2016) Diversity and distribution of ectomycorrhizal fungi from Amazonian lowland white-sand forests in Brazil and French Guiana. *Biotropica*, 48, 90–100.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning – Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup>. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sayers E.W., Barrett T., Benson D.A., Bryant S.H., Canese K., Chetvernin V., Church D.M., DiCuccio M., Edgar R., Federhen S., Feolo M., Geer L.Y., Helmberg W., Kapustin Y., Landsman D., Lipman D.J., Madden T.L., Maglott D.R., Miller V., ... Ye J. (2009) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 37, D5–D15.

Seress D., Dima B., Kovács G.M. (2015) Characterization of seven *Inocybe* ectomycorrhizal morphotypes from a semiarid woody steppe. *Mycorrhiza*, doi: 10.1007/s00572-015-0662-3

Singer R. (1970) Strobilomycetaceae (Basidiomycetes). In: *Flora Neotropica*, Monograph 5.

Singer R., Araujo I., Ivory M.H. (1983) The ectotrophically mycorrhizal fungi of the neotropical lowlands, especially Central Amazonia. *Beihefte zur Nova Hedwigia*, 77, 1–352.

Singer R., Morello J.H. (1960) Ectotrophic Forest tree mycorrhizae and forest communities. *Ecology*, 41, 549–551.

Smith S.E., Read D.J. (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. 3<sup>o</sup> ed. Academic Press, New York. 815p.

SOS Mata Atlântica (2021) Mata Atlântica. Available in: <https://www.sosma.org.br/causas/mata-atlantica/>. Accessed 20 Jul 2021.

Steiner A.Q., Amaral F.M.D., do Amaral J.R.D.B.C., Sassi R., Barradas J.I. (2015) Zonação de recifes emersos da Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais, Nordeste do Brasil. *Iheringia Série Zoologia*, 105, 184–192.

Sulzbacher M.A., Giachini A.J., Grebenc T., Silva B.D.B., Gurgel F.E., Loiola M.I.B., Neves M.A., Baseia I.G. (2013) A survey of an ectotrophic sand dune forest in the northeast Brazil. *Mycosphere*, 4, 1106–1116.

Sulzbacher M.A., Grebenc T., Nouhra E.R., Giachini A.J., Martín M.P., Baseia I.G. (2019) *Hysterangium atlanticum* sp. nov., forms ectomycorrhizae with *Coccoloba* species (Polygonaceae) from the Atlantic rainforest of Northeastern Brazil. *Symbiosis*, 78, 275–286.

Sulzbacher M.A., Orihara T., Grebenc T., Wartchow F., Smith M.E., Martín M.P., Giachini A.J., Baseia I.G. (2020) *Longistriata flava* (Boletaceae, Basidiomycota) – a new monotypic sequestrate genus and species from Brazilian Atlantic Forest. *Myckeys*, 62, 53–73.

Tedersoo L., Sadam A., Zambrano M., Valencia R., Bahram M. (2010) Low diversity and high host preference of ectomycorrhizal fungi in Western Amazonia, a neotropical biodiversity hotspot. *The ISME journal*, 4, 1–465.

Tedersoo L., Bahram M., Pölme S., Kõljalg U., Yourou N., Wijesundera R., Ruiz L.V., Vasco-Palacios A.M., Thu P.Q., Suija A., Smith M.A., ... Abarenkov K. (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346, 6213. <https://doi.org/10.1126/science.1256688>

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

Wartchow F., Maia L.C., Cavalcanti M.A.Q. (2012) Studies on *Amanita* (Agaricomycetidae, Amanitaceae) in Brazil: two yellow gemmatoid taxa. *Nova Hedwigia*, 96, 61–71.

Wartchow F. (2018) *Inocybe lepidosparta* (Agaricales: Basidiomycota): a new species from Pernambuco, Brazil. *New Zealand Journal of Botany*, 56, 438–443.

Wartchow, F. (2020) *Inocybe cavalcantiae*, a new species from northern Brazil. *Studies in Fungi*, 5, 1–5.

Weidlich E.W.A., Miotto P.T., Furtado A.N.M., Ferst L.M., Ernzen J.P., Neves, M.A. (2020) Using ectomycorrhizae to improve the restoration of neotropical coastal zones. *Restoration Ecology*. <https://doi.org/10.1111/rec.13284>

**CAPÍTULO 2 – Morpho-anatomical and molecular characterization of a native mycorrhizae *Amanita* species associated with *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) in the Brazilian Atlantic Forest**



## Short communication

## Morpho-anatomical and molecular characterization of a native mycorrhizal *Amanita* species associated with *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) in the Brazilian Atlantic Forest

Ariadne Nóbrega Marinho Furtado<sup>a\*</sup>, Ornella Comandini<sup>b</sup>, Marco Leonardi<sup>c</sup>, Andrea C. Rinaldi<sup>d</sup>, Maria Alice Neves<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, 88040-960, Florianópolis (SC), Brazil

<sup>b</sup> Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università degli Studi di Cagliari, Cittadella Universitaria, I-09042, Monserrato (CA), Italy

<sup>c</sup> Dipartimento di Medicina Clinica, Sanità Pubblica, Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università degli Studi di L'Aquila, I-67100, Coppito (AQ), Italy

<sup>d</sup> Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Cagliari, I-09042, Monserrato (CA), Italy

### ABSTRACT

In this work, we characterize naturally occurring mycorrhizae formed by *Amanita viscidolutea* on *Guapira opposita* in the Atlantic Forest in Brazil. We sequenced the rDNA ITS region from the mycorrhizae and basidiomata to identify both symbionts. *Amanita viscidolutea* mycorrhizae were up to 43 mm long, mostly simple, and unbranched to irregularly pinnate. The fungal mantle surface was velvety to slightly cottony and white to yellowish with silver patches. Hyphal strands were infrequently present. Although the fungal mantle consisted of clampless hyphae, emanating hyphae and hyphal strands had sparsely distributed clamp connections. A unique character of the mycorrhizae was the absence of a Hartig net.

**Keywords:** Amanitaceae, Hartig net, neotropical region, restinga, symbiosis.

**Article history:** Received 9 May 2021, Revised 31 January 2022, Accepted 6 February 2022, Available online 20 XXXX.

*Amanita* Pers. (Amanitaceae, Agaricales) is one of the most widely recognized groups of mushroom-forming fungi with a worldwide distribution (Bas, 1969). While a few *Amanita* species consistently grow as free-living saprotrophs (Wolfe, Tulloss, & Pringle, 2012; Tulloss et al., 2016), most species establish ectomycorrhizal symbioses with a wide range of hosts (e.g. Tedersoo & Brundrett, 2017) and play an important role in maintaining ecosystem dynamics (Gray & Kernaghan, 2020). In the tropics, *Amanita* species frequently occur in spatially restricted areas with monodominant or codominant ectomycorrhizal host trees, suggesting that many species have a small geographic range (Henkel et al., 2012; Mighell, Henkel, Koch, Goss, & Aime, 2019).

Around 35 species of *Amanita* have been described from South American lowland tropical forests, of which 25 have been recorded in native Brazilian forests, where the plant diversity is higher than the areas where other *Amanita* spp. have been found in the tropics. However, the mycorrhizal status of these species has been inferred by the occurrence of basidiomata near potential host plants rather than through observations of root tips (Roy et al., 2016). Only a few observations mentioned root tips, but the plants were not identified

(Singer, Araujo, & Ivory, 1983). Despite the ecological importance of naturally occurring *Amanita* mycorrhizae, the morpho-anatomy of the mycorrhizae is still poorly understood.

*Guapira* Aubl. (Nyctaginaceae, Caryophyllales) has ca. 70 species (Chagas & Costa-Lima, 2020) recorded from Mexico and the West Indies to Brazil, Paraguay, Peru and Ecuador (Moyersoen, 2012). This genus and other members of Nyctaginaceae are known to be ectomycorrhizal hosts throughout the tropics (Chambers, Hitchcock, & Cairney, 2005; Haug, Weiss, Homeier, Oberwinkler, & Kottke, 2005; Tedersoo, May, & Smith, 2010; Hayward & Horton, 2012) and exhibit specific fungal associations (Tedersoo, Sadam, Zambrano, Valencia, & Bahram, 2010).

In this work, we describe the mycorrhizae formed by *Amanita viscidolutea* Menolli, Capelari & Baseia on *Guapira opposita* (Vell.) Reitz based on morpho-anatomical and molecular data. This *Amanita* species is rare (Neves & Furtado, 2020) and only occurs in restinga, an Atlantic Forest vegetation type along coastal Brazil that is threatened by habitat loss and fragmentation due to human population growth and expansion (SOS Mata Atlântica, 2020).

Collections were made in Jun 2019 in the restinga in Parque Natural Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição in Florianópolis, Brazil (S 27.694028, W 48.506587; 90 m a.s.l.). We collected six soil samples, analyzed 33 roots, and observed fourteen *Amanita* mycorrhizae. This vegetation is associated with the Quaternary

\* Corresponding author. Laboratório de Micologia – MICOLAB- Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, 88040-960, Florianópolis (SC), Brazil.  
E-mail address: ariadnemf@gmail.com





coastal sand deposits and rocky coastal habitats (Magnago, Martin, Schaefer, & Neri, 2012) and grows on sandy soil between the ocean and forest. Possible host plants that grow in restinga include species of *Fabaceae*, *Moraceae*, *Myrtaceae*, *Nyctaginaceae*, *Polygonaceae* and *Salicaceae* (Binfaré, 2016). Even though the original description of *A. viscidolutea* includes *Coccoloba* as a possible host, there are no individuals of *Coccoloba* that occur in the restinga that we studied (Binfaré, 2016; Menolli Jr., Capelari, & Baseia, 2009). Specimens of *A. viscidolutea* (Fig. 1A) were identified by comparing them with the morphology described in the literature (Menolli Jr. et al., 2009; Wartchow, Maia, & Cavalcanti, 2012) and by using DNA barcoding of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal RNA gene (nrDNA ITS) region. The specimens were collected next to *G. opposita* plants (Fig. 1B). After conducting morphological analyses, the basidiomata were dried at 40 °C for further preservation. The identification of the plant was made by a botanist and confirmed by DNA barcoding of ITS region (Cheng et al., 2015). Soil samples (approximately 20 cm<sup>3</sup> each) were collected below the basidiomata and left in water overnight. The roots were washed and carefully selected under a stereomicroscope. Roots that had a fungal mantle were morphotyped. From each root system with a mantle, several tips were transferred to 70% ethanol and stored at -20 °C for the DNA analysis. Additionally, part of the root system with a mantle was fixed in 4% glutaraldehyde for the anatomical analysis. Voucher material of the basidiomata (ANMF 765 and ANMF 767), mycorrhizae (M70(A)R315, M70(B)R320, M70(C)R321, M70(D)R322, M70(E)R323, M70(F)R324, M70(G)R325, M70(H)R326, M70(I)R327, M70(J)R328, M70(K)R329, M70(L)R330 and M70(M)R332), and plants were deposited in the FLOR herbarium and fungarium and the permanent collection of the mycology laboratory (Micolab) at the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil.

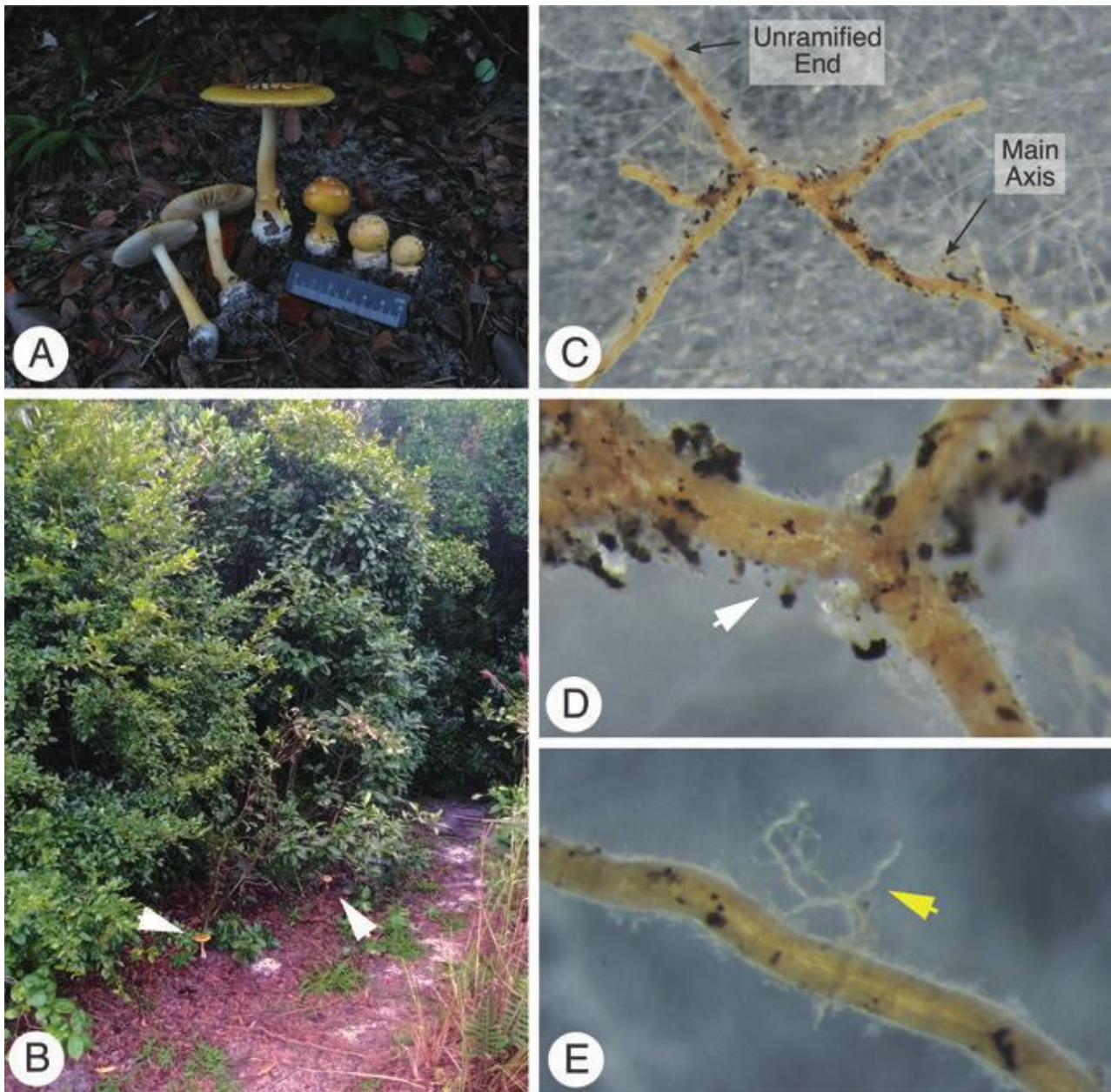
Scalped fungal mantles from root tips were fixed on microscope slides and observed under a compound light microscope (Axioplan 2, Zeiss, Jena) at 1000 × total magnification, at the University of Cagliari, Italy. Images were taken using a digital camera (DFC230, Leica, Wetzlar) attached to the microscope. The anatomical analyses were conducted at the University of L'Aquila (UnivAq), Italy. For these, mycorrhizal tips were embedded in LR White resin (Multilab Supplies, Surrey, UK), sectioned at 2.5 μm thick with a ultramicrotome (Ultracut R, Leica), stained with 1% toluidine blue in 1% sodium borate buffer for 10–15 s at 60 °C, observed with a microscope, and photographed using a digital camera. Ultrathin sections (60–80 nm) were made with a diamond knife, mounted on copper grids, and stained with UranylLess EM (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). The sections were examined using a transmission electron microscope (CM100, Philips, Eindhoven) operating at 80 kV and photographed with a digital camera (PHURONA, Emsis, Münster). The morphotype descriptions followed Agerer (1986, 1987–2012). Munsell Soil Color Charts (2000) were used as references to describe the colors of the mycorrhizae. The mycorrhizal descriptions were based on 6–10 root tips from six samples collected under *A. viscidolutea* basidiomata.

The molecular identification of the mycorrhizae was done at the Laboratório Multiusuário de Estudos de Biologia (LAMEB-UFSC), in Florianópolis, Brazil. Genomic DNA was extracted from the basidiomata using a DNA isolation kit (PowerPlant<sup>®</sup>Pro, MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA) and the manufacturer's protocol adapted for fungi. The nrDNA ITS region was amplified by PCR using the primers ITS1F and ITS4 (Gardes & Bruns, 1993) and the following cycling parameters: an initial denaturation at 94 °C for 2 min; 40 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 55 °C and 1 min at 72 °C; and a final extension at 72 °C for 7 min. A direct PCR approach was

applied to amplify the ITS region from the root tips (voucher M70(H)R326) isolated from soil samples (Iotti & Zambonelli, 2006). The mycorrhizal tips were selected and directly amplified using the same primer pair (ITS1F/ITS4). Two microliters of 20 mg/mL BSA (Bovine Serum Albumine) solution was added to each reaction tube to prevent PCR inhibition. The parameters applied to the PCR cycles followed Leonardi et al. (2013). To identify the plant host, DNA was extracted from the mycorrhizal root tips using an isolation kit (see above), and the ITS region for the plant was amplified using the ITS-u1 and ITS-u4 primer pair (Cheng et al., 2015) and the following cycling parameters: an initial denaturation at 94 °C for 4 min; 34 cycles of 30 s at 94 °C, 40 s at 55 °C and 1 min at 72 °C; and a final extension at 72 °C for 10 min. The DNA extracted from *G. opposita* leaves was used as a positive control. PCR products were purified using polyethylene glycol (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). Sanger sequencing was performed with a BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA) at the company Myleus Biotecnologia, in Minas Gerais, Brazil, following the manufacturer's instructions and using the same primers cited above for the correspondent symbionts. When needed, the generated sequences and their respective chromatograms were manually edited with Geneious R9 (Kearse et al., 2012). The newly generated sequences obtained from *G. opposita* leaves (MW000475), *A. viscidolutea* basidiomata (MW000472; MW000473) and the roots with the mycorrhizal mantle (MW000471) were compared to those in GenBank using a Blastn search. To identify the mycorrhizae, ITS sequences were compared with *Amanita* sequences from GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) and RDP Classifier (Wang, Garrity, Tiedje, & Cole, 2007), using the Warcup database (Deshpande et al., 2016) in the latter.

The mycorrhizal system did not become compact with age. It was mostly scattered (Fig. 1C), simple, unramified to irregularly pinnate, (1.5–)6.5–12.5(–17.5) mm long, mostly loose and long, and the main axis was 0.2–0.3 mm diam. The mantle surface was velvety to slightly cottony, white to yellowish with silver patches (HUE 2.5Y 8/2, 8/4, 8/6) to yellow (HUE 2.5Y 7/8) in older parts (Fig. 1D), and the unramified ends were mostly bent, sometimes straight, and (1.4–)2.6–4.7(–7.4) mm long and 0.1–0.2 mm diam. Hyphal strands were infrequently present, rounded, not ramified, connected to the mantle at a restricted point, and white (HUE 2.5Y 8/1) but lighter than the mantle surface. Emanating hyphae were scarce and thread-like (Fig. 1E). Sclerotia were absent.

The fungal mantle was (17–)23–25(–28) μm thick and had thin-walled hyphae and no tannin cells. Additionally, it often had three discernible layers, i.e., outer, middle, and inner layers. The outer layer (Fig. 2A) was weakly developed in some places, plectenchymatous, loose, composed of ramified and anastomosing hyphae, and formed a weak ring-like pattern. The hyphae in this layer were 7.5–10 × 5.0–6.5 μm, hyaline, smooth, thin-walled, clampless, with a globular thickening at the septa often present, and frequently ramified into short, finger-like branches. The middle layer looked like a transition between plectenchymatous and pseudoparenchymatous organization, with hyphae crossing in the longitudinal and transverse directions. The hyphae in this layer were 3.5–7.5 × 3.0–5.0 μm and sometimes interwoven with the inner layer. The inner layer (Fig. 2B) was plectenchymatous and more compact than the outer layer. The hyphae in this layer were 7.5–17 × 2.5–4.0 μm, hyaline, smooth, thin-walled, clampless, sometimes filled with homogeneous yellowish-green content, rather irregularly arranged and often grow in longitudinal directions, with at least some hyphal segments irregular in shape and enlarged. The emanating hyphae (Fig. 2C) were sparse, hyaline, 80–126 μm long, (1.5–)2–2.5 μm



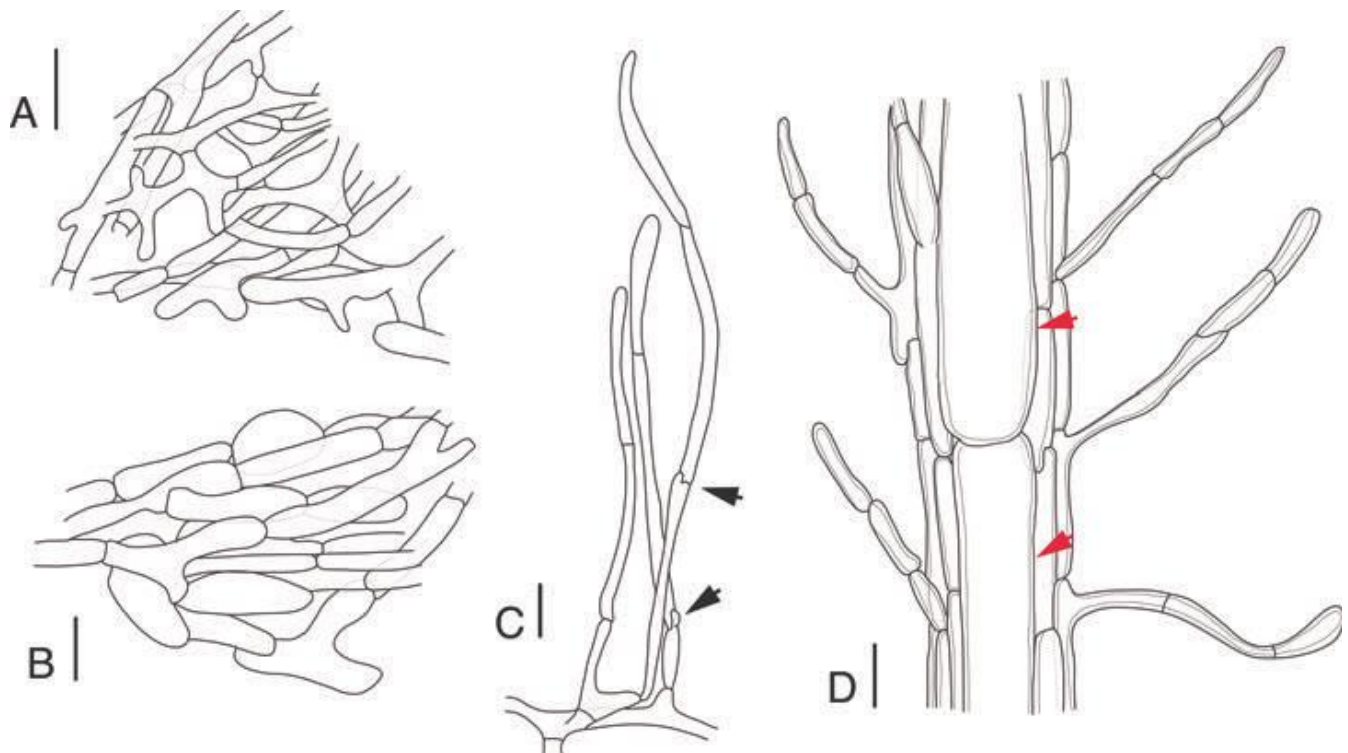
**Fig. 1** – *Amanita viscidolutea* basidiomata in habit and mycorrhizae in *Guapira opposita*. A: Basidiomata (ANMF 765). B: Collection site and plant habitat. White arrows indicate basidiomata of *A. viscidolutea*. C: Mycorrhizal root system of *G. opposita* showing the irregularly pinnate branching. D: Mantle surface with silver patches (white arrow). E: Hyphal strands (yellow arrow) connected to the mantle at a restricted point.

diam, not ramified; clamp connections were present but infrequent. The cell walls of these hyphae were smooth, thin, sometimes filled with homogeneous yellow content and awl-shaped, with slightly acuminate apical ends. Hyphal strands (Fig. 2D) were rarely present, started from restricted points on the mantle surface, and 16–26  $\mu\text{m}$  thick. The inner hyphae of these strands were highly differentiated with vessel-like structures in the center, 6–13(–16)  $\mu\text{m}$  diam, and thick-walled (up to 1  $\mu\text{m}$ ). The outer hyphae of these strands were loosely woven, hyaline, smooth, 2.8–4  $\mu\text{m}$  thick, clamped and often slightly thick-walled (up to 0.5  $\mu\text{m}$ ); the hyphal segments were often filled with yellow content or had gelatinized walls. Cystidia were absent.

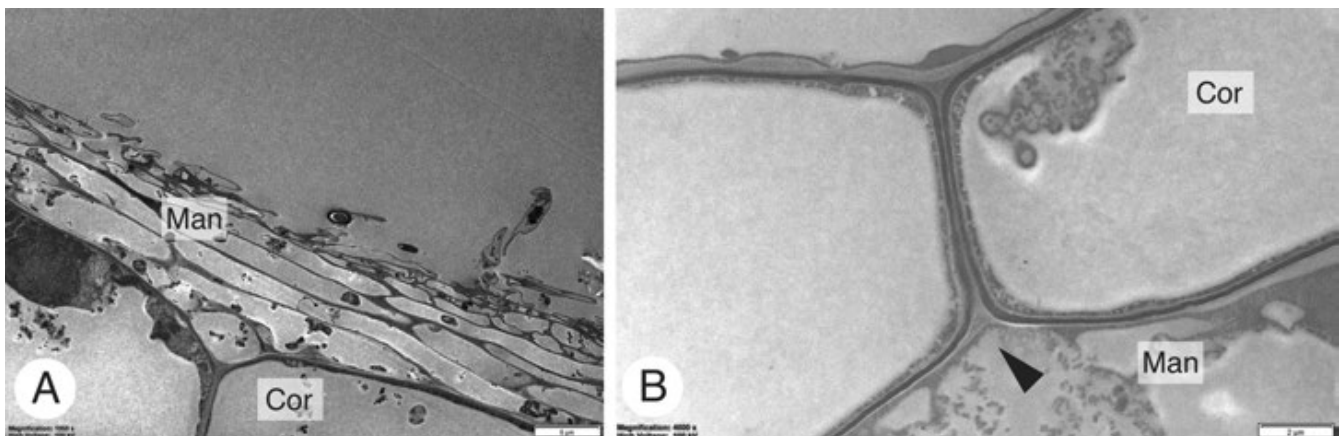
Electron microscopy (Fig. 3) revealed tight connections between

the layered fungal mantle and root cortical cells. No fungal intercellular and intracellular penetration was observed at the root cortex. The cortical cells were in 2–3 rows, longitudinally rectangular, (30–)45–62(–67)  $\times$  10–15(–25)  $\mu\text{m}$ , and tangentially oriented.

ITS sequences of *A. viscidolutea* basidiomata matched those from the scalped fungal mantles on *G. opposita* roots with 100% similarity, confirming the identity of the mycorrhizae collected. Reference sequences of *A. viscidolutea* (MN123998, MN123990, MN124011, MN124010) previously generated by our group and deposited in GenBank as *Amanita* sp. (Scheibler, 2019) also matched the data of *A. viscidolutea* basidiomata in the present study. The plant roots were identified as *G. opposita* with 100% similarity to *G. opposita* leaves.



**Fig. 2** – *Amanita viscidolutea* mycorrhizae (voucher M70(H)R326). A: Loosely plectenchymatous outer mantle layer. B: Plectenchymatous inner mantle layer. C: Emanating hyphae with clamp connections (black arrows). D: A hyphal strand with vessel-like central hyphae (red arrows). Bars: A–D 10  $\mu$ m.



**Fig. 3** – A: Longitudinal section of a mycorrhizae showing the fungus mantle covering the cortical cells of host plant root. B: Boundary between fungal mantle hyphae and cortical cells (black arrow). No epidermal cells are visible. Man: mantle; Cor: cortical cell. Bars: A 5  $\mu$ m; B 2  $\mu$ m.

The *A. viscidolutea* mycorrhiza had a thin mantle that was identical to general ectomycorrhizae of *Amanita* (Supplementary Table S1) but was unique because it lacked a Hartig net. In general, mantle hyphae of *Amanita* are clampless, but emanating hyphae and hyphal strands can have sparsely distributed clamp connections in *A. viscidolutea* and *A. muscaria* (Cuvelier, 1990). The mycorrhizal status of some *Guapira* species has been documented; however, no detailed descriptions of the mycorrhizae were given, and the fungus species were rarely identified (Alvarez-Manjarrez, Garibay-Orjuel, & Smith, 2017). Our study is the first detailed morpho-anatomical characterization of a native *Amanita* mycorrhiza associated with the native plant host *G. opposita* in restinga forest in South America. *Nyctaginaceae* is known to establish ectomycorrhiza-like

associations with a low number of fungal species in the neotropical region (Haug, Kottke, & Suárez, 2014; Corrales, Henkel, & Smith, 2018). The mycorrhizal status of this family is not homogeneous, i.e., several species have both arbuscular and ectomycorrhizal associations (Moyersoen, 1993; Teste, Jones, & Dickie, 2020), and other species are non-mycorrhizal (Tedersoo & Brundrett, 2017; Brundrett & Tedersoo, 2019). Mycorrhizal structures observed on *Pisonia* (*Nyctaginaceae*) have been defined as the “pisonioid” type, in which the Hartig net is poorly developed or not developed at all; instead, there are “transfer cells” in the root epidermis and cortex (Ashford & Allaway, 1982; Imhof, 2009). Haug et al. (2005) and Alvarez-Manjarrez et al. (2017) observed ectendomycorrhizae on *Guapira* associated with *Tomentella/Thelephora* and *Membrano-*

myces, in which intraradical hyphae and paraepidermal Hartig net hyphae were present on and between the root epidermal and cortical cells. However, the mycorrhiza of *A. viscidolutea* on *G. opposita* did not have an intraradical hyphal arrangement. This suggests that fungal penetration structures on the mycorrhizae vary in *Nyctaginaceae*. Intriguingly, besides in *Pisonia*, the absence of a Hartig net on mycorrhizae has been reported for *Achatocarpus gracilis* H. Walter (*Achatocarpaceae*, *Caryophyllales*) when associated with *Tremelloscypha* sp. and *Sebacina* sp. in a neotropical dry forest in Mexico (Alvarez-Manjarrez et al., 2017). Overall, this evidence suggests the significance of *Caryophyllales* as the hosts for “ectomycorrhizal fungi” in neotropical ecosystems. At this moment, it is hard to infer how *A. viscidolutea* fully exchanges nutrients with *G. opposita* without a Hartig net. It is possible that this is a new type of mycorrhiza that occurs in the neotropical region. Ecophysiological studies are necessary to better understand this symbiosis.

## Acknowledgements

This article is a part of the PhD thesis of ANMF. The authors thank LAMEB (UFSC, Brazil), especially William S. Oliveira and M.Sc. Maria Eduarda de A. Borges (Micolab/UFSC) for their support during the molecular work. We are indebted to Dr. Maria Giammatteo (UnivAq, Italy) for kindly providing microscopy images. We also thank the following: Dr. Mayara K. Caddah (UFSC, Brazil) for helping identify the plant; M.Sc. Gisele Scheibler (UFSC, Brazil) for helping identify the fungus; Dr. Savio T. Farias for helping during field expeditions; Nathan Smith for revising the English; and those at the FLOR herbarium and fungarium (UFSC, Brazil) for the support. The first author was supported by the *Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nivel Superior – Brazil – Finance Code 001* (CAPES-DS and PDSE fellowship grants).

## Disclosure Statements

## Competing interests

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## Availability of data and material

Details of the availability of the data and material used in this study can be found within the text. DNA sequences were submitted to the NCBI GenBank database.

## Authors' contributions

Ariadne Nóbrega Marinho Furtado, Andrea C. Rinaldi and Maria Alice Neves conceived the study. Ariadne Nóbrega Marinho Furtado collected the data, performed the molecular and phylogenetic analyses and led the writing of the manuscript. Ariadne Nóbrega Marinho Furtado, Ornella Comandini and Marco Leonardi conducted the morpho-anatomical analyses of the mycorrhizae. All authors actively partook in writing this manuscript and gave final approval for publication.

## References

- Agerer, R. (1986). Studies on ectomycorrhizae II. Introducing remarks on characterization and identification. *Mycotaxon*, 26, 473–492.
- Agerer, R. (1987–2012). *Colour atlas of ectomycorrhizae, 1–15 parts*. Einhorn-Verlag.
- Alvarez-Manjarrez, J., Garibay-Orjuel, R., & Smith, M. E. (2017). Caryophyllales are the main hosts of a unique set of ectomycorrhizal fungi in a Neotropical dry forest. *Mycorrhiza*, 28, 103–115. DOI: 10.1007/s00572-017-0807-7
- Ashford, A. E., & Allaway, W. G. (1982). A sheathing mycorrhiza on *Pisonia grandis* R. Br. (*Nyctaginaceae*) with development of transfer cells rather than a Hartig net. *New Phytologist*, 90, 511–519. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb07533.x
- Azul, A. M., Agerer, R., Martin, M. P., & Freitas, H. (2012). *Amanita phalloides* (Vaill. Ex Fr.) Link + *Quercus suber* L. *Description of Ectomycorrhizae*, 13, 1–5.
- Bas, C. (1969). Morphology and subdivision of *Amanita* and a monograph of its section *Lepidella*. *Persoonia*, 5, 285–573.
- Binfaré, R. W. (2016). *Guia ilustrado da flora da restinga de Santa Catarina*. [Master thesis dissertation, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil].
- Brundrett, M., & Tedersoo, L. (2019). Misdiagnosis of mycorrhizas and inappropriate recycling of data can lead to false conclusions. *New Phytologist*, 221, 18–24. DOI: 10.1111/nph.15440
- Chagas, E. C. O., & Costa-Lima, J. L. (2020). Re-evaluation of some Brazilian *Guapi-ira* (*Nyctaginaceae*) names: a new species, nomenclatural changes and typifications. *Systematic Botany*, 45, 173–182. DOI: 10.1600/036364420X15801369352441
- Chambers, S. M., Hitchcock, C. J., & Cairney, J. W. G. (2005). Ectomycorrhizal mycobionts of *Pisonia grandis* on coral cays in the Capricorn-Bunker group, Great Barrier Reef, Australia. *Mycological Research*, 109, 1105–1111. DOI: 10.1017/S0953756205003576
- Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, L., & Zhou, S. (2015). Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, 16, 138–149. DOI: 10.1111/1755-0998.12438
- Corrales, A., Henkel, T. W., & Smith, M. E. (2018). Ectomycorrhizal associations in the tropics-biogeography, diversity patterns and ecosystem roles. *New Phytologist*, 220, 1076–1091. DOI: 10.1111/nph.15151
- Cuvelier, J.-J. (1990). Caractérisation des ectomycorhizes de *Betula pendula* (L.) *Cortinariarius armillatus*, *Dermocybe phoenicea* et *Amanita muscaria*. *Belgian Journal of Botany*, 123, 73–91.
- Deshpande, V., Wang, Q., Greenfield, P., Charleston, M., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R., Cole, J. R., Midgley, D. J., & Tran-Dinh, N. (2016). Fungal identification using a Bayesian classifier and the Warcup training set of internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, 108, 1–5. DOI: 10.3852/14-293
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113–118. DOI: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x
- Gray, L., & Kernaghan, G. (2020). Fungal succession during the decomposition of ectomycorrhizal fine roots. *Microbial Ecology*, 79, 271–284. DOI: 10.1007/s00248-019-01418-3
- Haug, I., Kottke, I., & Suárez, J. P. (2014). Ectomycorrhizas of three species of *Nyctaginaceae* in the tropical mountain rain forest of South Ecuador. In: A. M. Bâ, K. L. McGuire, & A. G. Diédhiou (Eds.), *Ectomycorrhizal symbioses in tropical and neotropical forests* (pp. 19–28). CRC Press. DOI: 10.1201/b16536-3
- Haug, I., Weiss, M., Homeier, J., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2005). *Russulaceae* and *Thelephoraceae* form ectomycorrhizas with members of the *Nyctaginaceae* (*Caryophyllales*) in the tropical mountain rain forest of southern Ecuador. *New Phytologist*, 165, 923–936. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01284.x
- Hayward, J. A., & Horton, T. R. (2012). Edaphic factors do not govern the ectomycorrhizal specificity of *Pisonia grandis* (*Nyctaginaceae*). *Mycorrhiza*, 22, 647–652. DOI: 10.1007/s00572-012-0442-2
- Henkel, T. W., Aime, M. C., Chin, M. M. L., Miller, S. L., Vilgalys, R., & Smith, M. E. (2012). Ectomycorrhizal fungal sporocarp diversity and discovery of new taxa in *Dicymbe* monodominant forests of the Guiana Shield. *Biodiversity and Conservation*, 21, 2195–2220. DOI: 10.1007/s10531-011-0166-1
- Imhof, S. (2009). Arbuscular, ecto-related, orchid mycorrhizas—three independent structural lineages towards mycoheterotrophy: implications for classification? *Mycorrhiza*, 19, 357–363. DOI: 10.1007/s00572-009-0240-7
- Iotti, M., & Zambonelli, A. (2006). A quick and precise technique for identifying ectomycorrhizae by PCR. *Mycological Research*, 110, 60–65. DOI: 10.1016/j.mycres.2005.09.010
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647–1649. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts199
- Leonardi, M., Iotti, M., Oddis, M., Lalli, G., Pacioni, G., Leonardi, P., Maccherini, S., Perini, C., Salerni, E., & Zambonelli, A. (2013). Assessment of ectomycorrhizal fungal communities in the natural habitats of *Tuber magnatum* (*Ascomycota*, *Pezizales*). *Mycorrhiza*, 23, 349–358. DOI: 10.1007/s00572-012-0474-7
- Magnago, L. F. S., Martins, S. V., Schaefer, C. E. G. R., & Neri, A. V. (2012). Restinga forests of the Brazilian coast: richness and abundance of tree species on different soils. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 84, 807–822. DOI: 10.1590/S0001-37652012000300023

- Menolli Jr., N., Capelari, M., & Baseia, I. G. (2009). *Amanita viscidolutea*, a new species from Brazil with a key to Central and South American species of *Amanita* section *Amanita*. *Mycologia*, *101*, 395–400. DOI: 10.3852/07-079
- Mighell, K. S., Henkel, T. W., Koch, R. A., Goss, A., & Aime, M. A. (2019). New species of *Amanita* subgen. *Lepidella* from Guyana. *Fungal Systematics and Evolution*, *3*, 1–12. DOI: 10.3114/fuse.2019.03.01
- Mleczko, P. (2004). *Amanita citrina* (Schaeff.) S. F. Gray + *Pinus sylvestris* L. *Description of Ectomycorrhizae*, *7/8*, 1–10.
- Moyersoen, B. (1993). Ectomicorrizas y micorrizas vesiculo-arbusculares en Caatinga Amazónica del Sur de Venezuela. *Scientia Guaianae*, *n. 3*. [In Spanish].
- Moyersoen, B. (2012). Dispersion, an important radiation mechanism for ectomycorrhizal fungi in Neotropical lowland forests? In: P. Sudarshana, M. Nageswara-Rao, & J. R. Soneji (Eds.), *Tropical forests* (pp. 93–116). InTech. DOI: 10.5772/33217
- Neves, M. A., & Furtado, A. N. M. (2020). *Amanita viscidolutea*. The IUCN red list of threatened species 2020: e.T172740193A172861167.
- Raidl, S., & Verma, R. K. (2006). *Amanita strobiliformis* (Paulet: Vittad.) Bertill. + *Betula pendula* Roth. *Descriptions of Ectomycorrhizae*, *9/10*, 1–6.
- Roy, M., Schimann, H., Braga-Neto, R., da Silva, R. A. E., Duque, J., Frame, D., Warchow, F., & Neves, M. A. (2016). Diversity and distribution of ectomycorrhizal fungi from Amazonian lowland white-sand forests in Brazil and French Guiana. *Biotropica*, *48*, 90–100. DOI: 10.1111/btp.12297
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scandellari, F., & Agerer, R. (2012). *Amanita vinosa* (Fr.) Bertill. + *Tsuga canadensis* (L.) Carr. *Descriptions of Ectomycorrhizae*, *13*, 7–16.
- Scheibler, G. (2019). *Sistemática de Amanita Pers. (Amanitaceae, Basidiomycota) no Brasil*. [Master thesis, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil].
- Singer, R., Araujo, I., & Ivory, M. H. (1983). The ectotrophically mycorrhizal fungi of the neotropical lowlands, especially Central Amazonia. *Beihfte zur Nova Hedwigia*, *77*, 1–352.
- SOS Mata Atlântica. (2020). *Mata Atlântica*. Retrieved May 23, 2020, from <https://www.sosma.org.br/causas/mata-atlantica/>
- Tedersoo, L., May, T., & Smith, M. E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, *20*, 217–263. DOI: 10.1007/s00572-009-0274-x
- Tedersoo, L., Sadam, A., Zambrano, M., Valencia, R., & Bahram, M. (2010). Low diversity and high host preference of ectomycorrhizal fungi in Western Amazonia, a neotropical biodiversity hotspot. *The ISME Journal*, *4*, 1–465. DOI: 10.1038/ismej.2009.131
- Tedersoo, L., & Brundrett, M. (2017). Evolution of ectomycorrhizal symbiosis in plant. In: L. Tedersoo (Ed.), *Biogeography of mycorrhizal symbiosis* (pp. 407–467). Springer. DOI: 10.1007/978-3-319-56363-3\_19
- Teste, F. P., Jones, M. D., & Dickie, I. A. (2020). Dual-mycorrhizal plants: their ecology and relevance. *New Phytologist*, *225*, 1835–1851. DOI: 10.1111/nph.16190
- Tulloss, R. E., Kuijper, T. W. M., Vellinga, E. C., Yang, Z. L., Halling, R. E., Geml, J., Sanchez-Ramirez, S., Gonçalves, S. C., Hess, J., & Pringle, A. (2016). The genus *Amanita* should not be split. *Amanitaceae*, *1*, 1–16.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied Environmental Microbiology*, *73*, 5261–5267. DOI: 10.1128/AEM.00062-07
- Warchow, F., Maia, L. C., & Cavalcanti, M. A. Q. (2012). Studies on *Amanita* (*Agaricomycetidae*, *Amanitaceae*) in Brazil: two yellow gemmatoid taxa. *Nova Hedwigia*, *96*, 61–71. DOI: 10.1127/0029-5035/2012/0053
- Wolfe, B., Tulloss, R. E., & Pringle, A. (2012). The irreversible loss of a decomposition pathway marks the single origin of an ectomycorrhizal symbiosis. *PLoS ONE*, *7*, e39597. DOI: 10.1371/journal.pone.0039597

## 6 DISCUSSÃO GERAL

Os dados apresentados neste trabalho confirmam a presença de ectomicorrizas na restinga e sugerem a existência de uma diversidade, acima e abaixo do solo, maior do que a conhecida atualmente (Roy et al. 2016). Além disso foi possível confirmar o *status* ectomicorrízico de espécies nativas da restinga brasileira, tanto de fungos, quanto do simbionte vegetal, entre elas, *Amanita viscidolutea* e *Austroboletus festivus*. As novas informações obtidas para tais espécies foram importantes para complementar as informações acerca da biologia e distribuição destes táxons e permitiu incluí-los na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas de Extinção (*The IUCN Red List of Threatened Speceis*) na categoria Vulnerável A2c (Neves & Furtado 2020, Neves et al. 2020), uma ação essencial para proteção das espécies.

A alta frequência de representantes de /tomentella-thelephora como parceiros fúngicos é notável em nossos dados, assim como em outros estudos (Tedersoo et al. 2010b; Tedersoo et al. 2014): onze dos dezenove morfotipos sequenciados apresentaram grande similaridade com membros de Thelephoraceae. É amplamente reconhecido que muitas espécies da família são saprotróficas, no entanto, é possível que espécies ectomicorrízicas também ocupem nichos como saprotróficas para sobreviver a períodos em que não estão associadas ao simbionte vegetal (Suvi et al. 2010). Estudos anteriores indicam que muitos fungos teleforoides associados a membros da tribo Pisonieae (*Guapira*, *Neea* e *Pisonia*, exceto *P. grandis*) são generalistas, pois todos os fungos teleforoides encontrados associados a membros de Pisonieae também foram encontrados associados a outros simbiontes vegetais (Tedersoo et al. 2010b; Hayward & Horton 2014). Plantas ectomicorrízicas das famílias Polygonaceae, Caesalpiniaceae e Fabaceae ocorrem frequentemente nas mesmas regiões que as espécies de Pisonieae, de tal forma que a simbiose nestas espécies também deve ser examinada (Suvi et al. 2010; Tedersoo et al. 2010b; Hayward & Horton 2014).

Dentre todas as espécies encontradas em nosso levantamento, *Oidiodendron* cf. *maius* foi um dos táxons encontrado e que certamente foi uma grande surpresa. O morfotipo “M32” apresentou alta similaridade (99,35%) com a sequência argentina coletada em pelos radiculares de *Gaultheria poeppigii*. Embora não possamos confirmar que nossa amostra se refere a esta espécie, nossos dados sugerem que possivelmente pertencem ao mesmo gênero. *Oidiodendron maius* é uma espécie amplamente conhecida por estabelecer micorriza ericoide (restrita à família Ericaceae). Tradicionalmente, nas micorrizas ericoides, as hifas penetram nas paredes espessas das células epidérmicas das raízes sem o desenvolvimento de estruturas de adesão aparentes. Enrolados densos de hifas são então produzidos dentro de cada célula da raiz

epidérmica e circundadas por uma interface apoplástica cercada por uma extensão da membrana plasmática da planta. Apesar de não ter realizado um estudo anatômico detalhado da amostra em questão, trazemos o registro inédito de *Oidiodendron* formando uma estrutura típica de fungos ectomicorrízicos e associando-se a outra espécie vegetal que não pertence a Ericaceae. O resultado do sequenciamento de DNA do manto ectomicorrízico confirma que os vouchers coletados por nós estão associados à raiz de *Guapira opposita*, que pertence à família Nyctaginaceae (Caryophyllales). O genoma de *Oidiodendron maius* contém ainda numerosas lipases, proteases e enzimas de metabolismo secundário assim como fungos saprotróficos e endofíticos não micorrízicos (Perotto et al. 2018). Esta característica justifica sua biologia dupla e sua capacidade saprotrófica como resultado de uma transição incompleta evolutiva do hábito saprotrófico para o micorrízico, provavelmente devido a origem recente dessas simbioses, ambas encontradas exclusivamente em táxons de angiospermas (Genre et al. 2020).

Outro resultado inesperado foram as altas porcentagens de similaridade do morfotipo M50 com amostras coletadas nas raízes de duas espécies pertencentes a família Ericaceae – *Enkianthus perulatus* (97.25%) e *Erica mammosa* (97.42%). Assim como no caso de *Oidiodendron* sp. (morfotipo M32), apesar de não termos um estudo detalhado da anatomia da associação – visão da simbiose em secção longitudinal – a fim de entender como estes simbioses se relacionam e quais estruturas são formadas, é observada a formação de um manto ectomicorrízico, cuja sequência de DNA do simbionte vegetal aponta para sua associação com a raiz de *Guapira opposita*. Ainda não temos dados suficientes para entender a relação de *Guapira opposita* com os morfotipos M32 e M50, e talvez os mesmos estejam estabelecendo micorrização do tipo ericoide com o simbionte em questão. No entanto, entendemos que a mudança da simbiose para uma linhagem de fungo ainda não descrita foi provavelmente um evento chave na evolução das micorrizas ericoides. Mas o primeiro fungo ericoide também pode ter sido um associado ectomicorrízico (Vrålstad et al. 2000; Brundrett 2002).

Em florestas tropicais e neotropicais, plantas simbioses ectomicorrízicas são ditas como raras, mas os gêneros ectomicorrízicos mais frequentes, como *Coccoloba* (Polygonaceae), *Neea* e *Guapira* (Nyctaginaceae), *Dicymbe* (Caesalpinaceae), *Aldina* (Fabaceae) e *Pakaraimea* (Dipterocarpaceae selvagem) podem variar em abundância, formando componentes florestais menores (Tedersoo et al. 2010b) ou formando grandes extensões de floresta quase monodominante (Henkel 2003; Smith et al. 2013). Ainda não entendemos o porquê de *Guapira opposita* ter sido o simbionte mais frequente em nossas amostras, uma vez que outros possíveis parceiros ocorrem também nos fragmentos de restinga estudados e incluem membros de Fabaceae, Moraceae, Myrtaceae, Polygonaceae e Salicaceae

(Binfaré & Falkenberg 2017). Talvez o seu papel ecológico como planta facilitadora, auxiliando no estabelecimento e desenvolvimento de outras espécies vegetais, permita que esta espécie atue como planta monodominante nestes ecossistemas de restinga. No entanto, tem sido proposto que as diferenças na abundância de plantas ectomicorrízicas entre os neo e os paleotrópicos sejam um produto da história evolutiva dessas duas regiões, ao invés de diferenças nas condições ambientais entre as duas, como a disponibilidade de nitrogênio (Martin et al. 2016).

O sistema radicular de *Guapira opposita* se ramifica repetidamente (Apêndice E), formando um sistema pinado monopodial, ramificado até a 3ª ordem; a raiz apresenta uma superfície ligeiramente fibrilosa, brilhante, vermelha amarelada (HUE 5YR 4/6) quando jovem, tornando-se muito vermelha (HUE 2,5YR 2,5 / 2) com a idade. Na presença das ectomicorrizas, no entanto, as raízes passam a ramificar até 4ª e 5ª ordem e a superfície adquire a coloração e constituição equivalentes ao manto micorrízico característico de cada táxon associado. Além disso, e assim como observado nos capítulos 1 e 2, as ectomicorrizas encontradas formam um manto conspícuo, não apresentam uma rede de Hartig ou outra estrutura de transferência intraradicular (Apêndices C e F). Ashford e Allaway (1985), Moyersoen (1993), Haug et al. (2005) e Haug e colaboradores (2014) demonstraram que as espécies de Nyctaginaceae com sistema radicular longo (*Pisonia grandis*, *Neea robusta*, *Neea aff. floribunda*, *Pisonia* sp.) exibiram um desenvolvimento incompleto do manto ectomicorrízico e nenhuma supressão na formação dos pelos da raiz. Nenhuma destas características foi observada na simbiose formada entre *Guapira opposita* e *Amanita viscidolutea*, *Austroboletus festivus*, *Tomentella* sp1 (M36), *Tomentella* sp2 (M36') e os demais fungos simbiontes apresentados neste trabalho. No entanto, concordamos que as particularidades das associações com algumas nictagináceas, como as citadas pelos autores acima, podem representar um passo inicial na mudança evolutiva da micorrização arbuscular para ectomicorrização. Essa possível transição de micorrização arbuscular para ectomicorrização “típica” pode estar representada em outras espécies de plantas, inclusive outras Nyctaginaceae, formadoras de raízes curtas (*Neea obovata*, *Neea* sp1. e *Guapira sancarlosiana*). Neste caso, e considerando nossos resultados, a ausência de rede Hartig seria outra indicação da plasticidade e peculiaridade da biologia micorrízica desta família de plantas hospedeiras.

O conceito morfológico atual de ectomicorrizas é resultado de anos de investigação da simbiose em florestas temperadas. Ainda que este conceito tenha se mantido engessado durante décadas, estudos antigos somados às novas evidências (Ashford & Allaway 1985; Haug et al. 2005; 2014; Álvarez-Manjarrez et al. 2017; Álvarez-Manjarrez et al. 2021) têm demonstrado



que variações morfológicas e anatômicas das ectomicorrizas de florestas tropicais e neotropicais são mais frequentes do que se imaginava, de tal forma que urge a necessidade de aplicarmos um novo nome às associações encontradas nos ecossistemas tropicais. As variações apresentadas nesta tese refletem a dinâmica ecológica e fisiológica da restinga, um ecossistema único e extremo, que exige adaptações específicas e uma alta plasticidade ecológica.

Com base no que se sabe, membros de Nyctaginaceae estabelecem associações micorrízicas com um baixo número de espécies de fungos na região Neotropical (Haug et al. 2014; Corrales et al. 2018). Apesar de apenas algumas espécies terem sido estudadas em detalhes, o status micorrízico da família não é homogêneo, com várias espécies confirmadas como formadoras de micorrizas arbusculares e ectomicorrizas (Moyersoen 1993; Teste et al. 2020) e outras consideradas não micorrízicas (Tedersoo & Brundrett 2017; Brundrett & Tedersoo, 2019). Embora bastante interessante, o potencial de plantas duplo-micorrízicas é muito subestimado e isso provavelmente explica por que se sabe tão pouco sobre elas (Teste et al. 2020). Elas oferecem grande potencial para determinar qual tipo de micorriza oferece os maiores benefícios ou custos para as plantas simbiotes, bem como quais seriam os benefícios ou custos para a planta se especializar em apenas um tipo (Martin et al. 2016). Neste trabalho, não tivemos a oportunidade de investigar a fundo o papel da micorrização dupla nas nictagináceas. No entanto, esse estudo se faz necessário uma vez que plantas com dois tipos de micorrizas fornecem evidências de como as micorrizas arbusculares e as ectomicorrizas compartilham nichos fundamentais, sistema radicular e nutrientes do solo (Teste et al. 2020).

## 7 CONCLUSÃO

O estudo morfológico e anatômico detalhado das ectomicorrizas associadas a plantas de restinga permite não só ampliar nosso conhecimento acerca da diversidade fúngica que ocorre nesses ecossistemas como também permite reconhecer e documentar variações estruturais da simbiose ectomicorrízica. Os resultados apresentados nesta tese fortalecem dados gerados em outros estudos de mesma vertente e que vêm sendo realizados para outros ecossistemas neotropicais. Conjuntamente, eles corroboram a existência de particularidades morfo-anatômicas das ectomicorrizas e a necessidade de propormos um novo nome que inclua as ectomicorrizas que se encaixam no conceito de ectomicorrizas incipientes.

Embora as ectomicorrizas de restinga encontradas associadas à *Guapira opposita* apresentem particularidades morfológicas inerentes à espécie fúngica associada,

anatomicamente, elas apresentam uma constância: não desenvolvem a rede de Hartig ou hifas intraradiculares, e as raízes da planta hospedeira não apresentam a camada epidérmica. Por mais que a ausência destas estruturas levante questionamentos acerca da biologia da associação, estudos preliminares demonstraram que os fungos ectomicorrízicos associados às raízes de *G. opposita* afetam seu crescimento, principalmente em relação à biomassa da parte aérea (Slodkowski 2020).

Estudos sobre a diversidade de micorrizas com abordagem morfoanatômica ainda estão em fase preliminar no Brasil. Até o momento, há apenas um outro estudo que inclui uma descrição detalhada das características de uma micorriza (*Hysterangium atlanticum* + *Coccoloba* spp.), que é do nordeste do Brasil (Sulzbacher et al. 2019). Os estudos que vêm sendo desenvolvidos no Brasil corroboram a necessidade urgente de melhor compreender a diversidade subterrânea na Mata Atlântica, especialmente considerando que a restinga potencialmente abriga uma comunidade única de táxons micorrízicos (Sulzbacher et al. 2013a, 2013b; Vanegas-León et al. 2019).

Atualmente, sabe-se que a maior disponibilidade de macronutrientes descartáveis, em ambientes ricos em micorrizas, favorece a recuperação de ecossistemas. Os resultados obtidos a partir deste trabalho possibilitam a discussão do impacto que essas associações apresentam na formação e manutenção do ecossistema e no estabelecimento de plântulas em solos arenosos (Weidlich et al. 2020). Ainda, esperamos que, em parceria com pesquisadores envolvidos em trabalhos de conservação e manejo de áreas degradadas, seja possível o estabelecimento de planos de restauração, manejo e conservação da biodiversidade inerente a essas áreas ainda tão ameaçadas. Para a Ilha de Santa Catarina, esperamos que os resultados desta tese sirvam de base para elaboração de planos futuros efetivos e específicos para as áreas de restinga que cada vez mais têm sido exploradas pelo crescimento imobiliário.

## 8 REFERÊNCIAS

- Agerer R. (1986) Studies on ectomycorrhizae II. Introducing remarks on characterization and identification. *Mycotaxon*, 26, 473–492.
- Agerer R. (1987–2012) *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. 15 parts. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd.
- Agerer R. (1991) Characterization of ectomycorrhiza. In: *Methods in Microbiology*. Vol. 23. *Techniques for the Study of Mycorrhiza*. Norris J.R., Read D.J., Varma A.K. (eds) Academic Press, San Diego, pp 25–73.

- Agerer R. (1995) Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt towards a natural classification. In: Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology. Varma A., Hock, B. (eds.) Berlin: Springer-Verlag, pp. 685–734.
- Alexander I.J. (2006) Ectomycorrhizas - out of Africa? *New Phytologist*, 172, 589–591.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myer E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410.
- Álvarez-Majarez J., Garibay-Orijel R., Smith M.E. (2017) Caryophyllales are the main hosts of a unique set of ectomycorrhizal fungi in a Neotropical dry forest. *Mycorrhiza*, 28, 103–115.
- Álvarez-Manjarrez J., Solís Rodríguez A.U., Villarruel-Ordaz J.L., Ortega-Larrocea M. del P., Garibay-Orijel R. (2021) Micorrizas del bosque tropical caducifolio y otras simbiosis fúngicas. *Acta Botanica Mexicana*, 128: e1906. doi: <https://doi.org/10.21829/abm128.2021.1906>.
- Arnebrant K., Ek H., Finlay R.D., Soderstrom B. (1993) Nitrogen translocation between *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. seedlings inoculated with *Frankia* sp. and *Pinus contorta* Dougl. Ex. Loud seedlings connected by a common ectomycorrhizal mycelium. *New Phytologist*, 124, 213–242.
- Ashford A.E., Allaway, W.G. (1982) A sheathing mycorrhiza on *Pisonia grandis* R. Br. (Nyctaginaceae) with development of transfer cells rather than a Hartig net. *New Phytologist*, 90, 511–519.
- Barto E.K., Weidenhamer J.D., Cipollini D., Rillig M.C. (2012) Fungal superhighways: do common mycorrhizal networks enhance belowground communication? *Trends in Plant Science*, 17, 633–637.
- Binfaré R.W., Falkenberg D. B. (2017) Guia ilustrado da Flora da restinga da Santa Catarina. Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil.
- Bonfante P., Genre A. (2010) Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1, 48.
- Brown K.S.Jr., Brown G.G. (1992) Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. In: Tropical deforestation and species extinction. Whitmore J.H., Sayer J.A. editors. Chapman and Hall, London, England, pp. 199–142.
- Brundrett M.C. (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154, 275–304.
- Brundrett M.C., Tedersoo L. (2018) Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220, 1108–1115.
- Brundrett M., Tedersoo L. (2019) Misdiagnosis of mycorrhizas and inappropriate recycling of data can lead to false conclusions. *New Phytologist*, 221, 18–24.

- Cheng T., Xu C., Lei L., Li C., Zhang L., Zhou, S. (2015) Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, 16, 138–149.
- Comandini O., Rinaldi A.C. (2001) Together, but not for ever: ectomycorrhizal symbiosis is an unstable affair. *Mycological Research*, 105, 130–131.
- Comandini O., Contu M., Rinaldi A.C. (2006) An overview of *Cistus* ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 16, 381–395.
- Comandini O., Rinaldi A.C., Kuyper T.W. (2012) Measuring and estimating ectomycorrhizal fungal diversity: a continuous challenge. In: *Mycorrhiza: occurrence in natural and restored environments*. Pagano, M. editor. Nova Science Publishers, New York, pp. 165–200.
- Corrales A., Mangan S.A., Turner B.L., Dalling J.W. (2016) An ectomycorrhizal nitrogen economy facilitates monodominance in a neotropical forest. *Ecology Letters*, 19, 383–392.
- Corrales A., Henkel T.W., Smith, M.E. (2018) Ectomycorrhizal associations in the tropics-biogeography, diversity patterns and ecosystem roles. *New Phytologist*, 220, 1076–1091.
- CRIA - Centro de Referência e Informação Ambiental (2021) Specieslink - simple search. Disponível em <http://www.splink.org.br/index>. Acesso em 08 Mai 2021.
- Falkenberg D.B. (1999) Aspectos da Flora e da vegetação secundária da restinga de Santa Catarina, sul do Brasil. *Insular*, 28, 1–30.
- Ferlian O., Biere A., Bonfante P., Buscot F., Eisenhauer N., Fernandez I., Hause B., Herrmann S., Krajinski-Barth F., Meier I.C., Pozo M.J., Rasmann S., Rillig M.C., Tarkka M.T., van Dam N.M., Wagg C., Martinez-Medina A. (2018) Growing research networks on mycorrhizae for mutual benefits. *Trends in Plant Science*, 23, 975–984.
- Fine P.V., Garca-Villacorta R., Pitman N.C., Mesones I., Kembel S.W. (2010) A floristic study of the white-sand forests of Peru. I. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 97, 283–305.
- Gardes M., Bruns, T.D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113–118.
- Genre A., Lanfranco L., Perotto S., Bonfante P. (2020) Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nature Reviews*, <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0402-3>
- Giachini A., de Oliveira V.L., Castellano M.A., Trappe J.M. (2000) Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. *Mycologia*, 92, 1166–1177.
- Giachini A., Souza L.A.B., Oliveira V.L. (2004) Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunnii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. *Mycorrhiza*, 14, 375–381.
- Gilbert L., Johnson D. (2017) Plant-plant communication through common mycorrhizal networks. *Advances in Botanical Research*, 82, 83–97.

- Haug I., Weiss M., Homeier J., Oberwinkler F., Kottke I. (2005) Russulaceae and Thelephoraceae form ectomycorrhizas with members of the Nyctaginaceae (Caryophyllales) in the tropical mountain rain forest of southern Ecuador. *New Phytologist*, 165, 923–936.
- Haug, I., Kottke, I., & Suárez, J. P. (2014) Ectomycorrhizas of three species of Nyctaginaceae in the tropical mountain rain forest of South Ecuador. In: *Ectomycorrhizal symbioses in tropical and neotropical forests*. Bâ A M., McGuire K.L., Diédhiou A.G. (eds.) CRC Press, Boca Raton, FL, pp 19–28.
- Hawksworth D.L., Lücking R. (2017) Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million Species. *Microbiology Spectrum*, 5.
- Hayward J., Horton T. (2014) Phylogenetic trait conservation in the partner choice of a group of ectomycorrhizal trees. *Molecular Ecology*, 23, 4886–4898.
- Henkel T.W. (2003) Monodominance in the ectomycorrhizal *Dicymbe corymbosa* (Caesalpinaceae) from Guyana. *Journal of Tropical Ecology*, 19, 417–437.
- Iotti M., Zambonelli, A. (2006) A quick and precise technique for identifying ectomycorrhizae by PCR. *Mycological Research*, 110, 60–65.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P., Drummond, A. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647–1649.
- Kennedy P.G., Matheny P.B., Ryberg K.M., Henkel T.W., Uehling J.K., Smith M.E. 2012. Scaling up: examining the macroecology of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*, 21, 4151–4154.
- Leonardi M., Iotti M., Oddis M., Lalli G., Pacioni G., Leonardi P., Maccherini S., Perini C., Salerni E., Zambonelli A. (2013) Assessment of ectomycorrhizal fungal communities in the natural habitats of *Tuber magnatum* (Ascomycota, Pezizales). *Mycorrhiza*, 23, 349–358.
- Magnago L.F.S., Martins S.V., Schaefer C.E.G.R., Neri A.V. (2012) Restinga forests of the Brazilian coast: richness and abundance of tree species on different soils. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 84, 807–822.
- Martin F., Kohler A., Murat C., Veneault-Fourrey C., Hibbett D. (2016) Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 760–773.
- Matheny P.B., Aime M.C., Bougher N.L., Buyck B., Desjardin D.E., Horak E., Kropp B.R., Lodge D.J., Soyong K., Trappe J.M., Hibbett D. (2009) Out of the Palaeotropics? Historical biogeography and diversification of the cosmopolitan ectomycorrhizal mushroom family Inocybaceae. *Journal of Biogeography*, 36, 577–592.
- Morellato L.P.C., Haddad C.F.B. (2000) Introduction: the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*, 32, 786–792.

- Moyersoen B. (1993) Ectomicorrizas y micorrizas vesículo-arbusculares en Caatinga Amazónica del Sur de Venezuela. *Scientia Guaianae*, 3.
- Neves M.A., Furtado A.N.M. (2020) *Amanita viscidolutea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T172740193A172861167.  
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T172740193A172861167.en>
- Neves M.A., Furtado A.N.M., Cardoso J.S. (2020) *Austroboletus festivus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T172740512A172861192.  
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T172740512A172861192.en>
- Ometto J.C. (1981) *Bioclimatologia Tropical*. São Paulo: Agronômica Ceres, pp. 390–398.
- Pandolfo C.; Braga H.J., Silva Jr. V.P.; Massignam A.M., Pereira E.S., Thomé V.M.R., Valci F.V. (2002) *Atlas climatológico digital do Estado de Santa Catarina*. Florianópolis: Epagri.
- Peay K.G., Kennedy P.G., Bruns T.D. (2008) Fungal community ecology: A hybrid beast with a molecular master. *Bioscience*, 58, 799–810.
- Peay K.G. (2016) The mutualistic niche: mycorrhizal symbiosis and community dynamics. *Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics*, 47, 143–164.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-121415-032100>
- Pérez-Pazos E., Certano A., Gagne J., Lebeuf R., Siegel N., Nguyen N., Kennedy P.G. (2021) The slippery nature of ectomycorrhizal host specificity: *Suillus* fungi associated with novel pinoid (*Picea*) and abietoid (*Abies*) hosts, *Mycologia*. Doi: 10.1080/00275514.2021.1921525
- Perotto S., Daghino S., Martino, E. (2018) Ericoid mycorrhizal fungi and their genomes: another side to the mycorrhizal symbiosis? *New Phytologist*, 220, 1141–1147.
- Perry D. (1994) *Forest ecosystems*. Baltimore, Md.: John Hopkins Press. 649p.
- Peterson R.L., Massicotte H.B. (2004) Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1074–1088.
- Peterson R.L., Massicotte H.B., Melville L.H. (2004) *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. Toronto, Canada: CABI. 196p.
- Pickles B.J., Simard S.W. (2017) Mycorrhizal networks and forest resilience to drought. In: *Mycorrhizal mediation of soil: fertility, structure, and carbon storage*. Johnson N.C., Gehring C., Jansa J. (eds). Elsevier, New York. 526p.
- Põlme S., Bahram M., Jacquemy H., Kennedy P., Kohout P., Moora M., Oja J., Öpik M., Pecoraro L., Tedersoo L. (2017) Host preference and network properties in biotrophic plant-fungal associations. *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.14895
- Rhodes C.J. (2017) The whispering world of plants: ‘The Wood Wide Web’. *Science Progress*, 100, 331–337.

- Rinaldi A.C., Comandini O., Kuyper T.W. (2008) Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity*, 33, 1–45.
- Roy M., Vasco-Palacios A., Geml J., Buyck B., Delgat L., Giachini A., Grebenc T., Harrower E., Kuhar F., Magnago A.C., Rinaldi A.C., Schimann H., Selosse M-A., Sulzbacher M.A., Wartchow F., Neves M.A. (2017) The (re)discovery of ectomycorrhizal symbioses in Neotropical ecosystems sketched in Florianópolis. *New Phytologist*, 214, 920–923.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning – Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup>. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shah F., Nicolás C., Bentzer J., Ellström M., Smits M., Rineau F., Canbäck B., Floudas D., Carleer R., Lackner G., Braesel J., Hoffmeister D., Henrissat B., Ahrén D., Johansson T., Hibbett D., Martin F., Persoon P., Tunlid A. (2015) Ectomycorrhizal fungi decompose soil organic matter using oxidative mechanisms adapted from saprotrophic ancestors. *New Phytologist*, 209, 1705–1719. doi: 10.1111/nph.13722
- Silva-Flores P., Argüelles-Moyao A., Aguilar-Paredes A., Calaça F.Jr.S., Duchicela J., Fernández N., Furtado A.N.M., Guerra-Sierra B., Lovera M., Marín C., Neves M.A., Pezzani F., Rinaldi A.C., Rojas K., Vasco-Palacios A.M. (2021) Mycorrhizal science outreach: Scope of action and available resources in the face of global change. *Plants, People, Planet*, 1–17.
- Simard S.W., Perry D.A., Joner M.D., Myrold D.D., Durall D.M., Molina R. (1997) Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature*, 388, 579–582.
- Simard S.W. (2018) Mycorrhizal networks facilitate tree communication, learning and memory. In: *Memory and Learning in Plants. Signaling and Communication in Plants*. Baluska F., Gagliano M., Witzany G., editors. Springer, Cham pp. 191–213.
- Siqueira J.O., de Souza F.A., Cardoso E.J.B.N., Tsai S.M. (2010) *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras: Editora UFLA. 716p.
- Singer R., Araujo I.J.S. (1979) 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*, 9, 25–42.
- Singer R., Aguiar I.A. (1986) Litter decomposing and ectomycorrhizal basidiomycetes in an Igapó Forest. *Plant Systematics and Evolution* 153: 107–117.
- Slodkwoski M.C. (2021) Contribuições das ectomicorrizas sobre o metabolismo da *Guapira opposita* (Veill.) Reitz (Nyctaginaceae Juss.), uma espécie-chave na sucessão da restinga. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasi. 64p.
- Smith S.E., Read D.J. (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. 3<sup>o</sup> ed. Academic Press, New York. 815p.
- Smith M.E., Henkel T.W., Uehling J.K., Fremier A.K., Clarke H.D., Vilgalys R. (2013) The ectomycorrhizal fungal community in a neotropical forest dominated by the endemic dipterocarp *Pakaraimaea dipterocarpacea*. *PLoS One*, 8, e55160.

Sobestiansky G. (2005) Contribution to a macromycete survey of the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina in Brazil. *Biological and Applied Sciences*, 48, 437–457. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000300015>

SOS Mata Atlântica (2021) Mata Atlântica. Available in: <https://www.sosma.org.br/causas/mata-atlantica/>. Accessed 20 Jul 2021.

Stamets P. (2005) *Mycelium running: how mushrooms can help save the world*. First edition, Ten Speed Press, New York. 343 p.

Strullu-Derrien C., Selosse M.-A., Kenrick P., Martin F.M. (2018) The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: from paleomycology and phylogenomics. *New Phytologist*, doi: 10.1111/nph.15076

Sulzbacher M.A., Giachini A.J., Grebenc T., Silva B.D.B., Gurgel F.E., Loiola M.I.B., Neves M.A., Baseia I.G. (2013a) A survey of an ectotrophic sand dune forest in the northeast Brazil. *Mycosphere*, 4, 1106–1116.

Sulzbacher M.A., Grebenc T., Jacques R.J.S., Antonioli Z.I. (2013b) Ectomycorrhizal fungi from southern Brazil – a literature-based review, their origin and potential hosts. *Mycosphere*, 4, 61–95.

Sulzbacher M.A., Grebenc T., Nouhra E.R., Giachini A.J., Martín M.P., Baseia I.G. (2019) *Hysterangium atlanticum* sp. nov., forms ectomycorrhizae with *Coccoloba* species (Polygonaceae) from the Atlantic rainforest of Northeastern Brazil. *Symbiosis*, 78, 275–286.

Suvi T., Tedersoo L., Abarenkov K., Beaver K., Gerlach J., Kõljalg U. (2010) Mycorrhizal symbionts of *Pisonia grandis* and *P. sechellarum* in Seychelles: identification of mycorrhizal fungi and description of new *Tomentella* species. *Mycologia*, 102, 522–533.

Tedersoo L., Suvi T., Beaver K., Kõljalg U. (2007) Ectomycorrhizal fungi of the Seychelles: diversity patterns and host shifts from the native *Vateriopsis sechellarum* (Dipterocarpaceae) and *Intsia bijuga* (Caesalpiniaceae) to the introduced *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae), but not *Pinus caribea* (Pinaceae). *New Phytologist*, 175, 321–333. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02104.x>

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

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

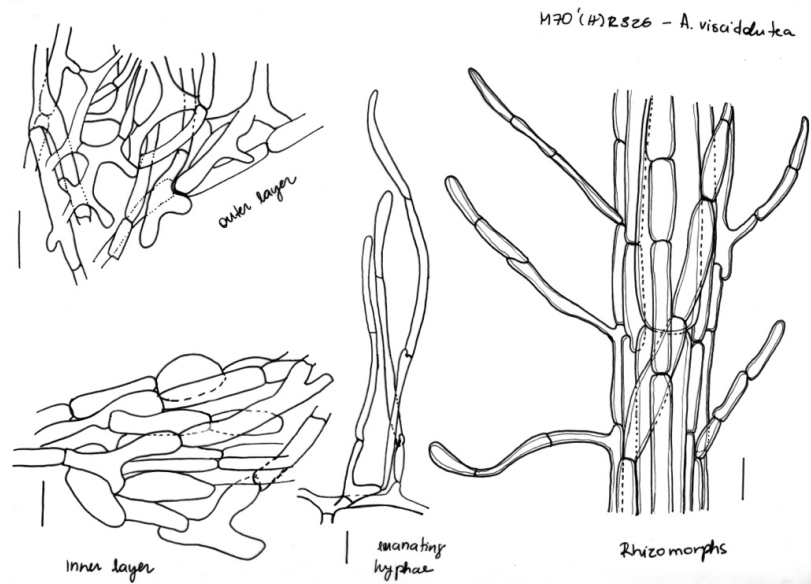
Tedersoo L., Bahram M., Toots M., Diédhiou A., Henkel T.W., Kjøller R., Morris M.H., Nara K., Nouhra E., Peay K.G., Põlme S., Ryberg M., Smith M.E., Kõljalg U. (2012) Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*, 21, 4160–4170.



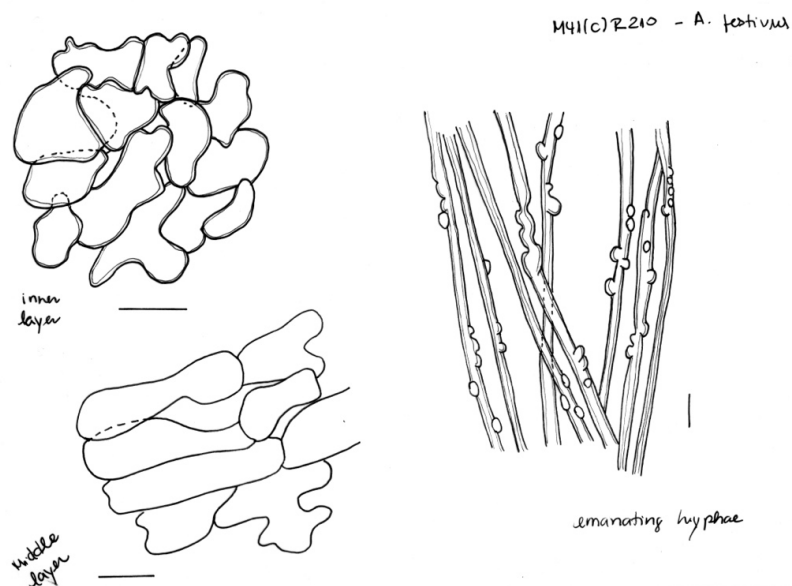
- Tedersoo L., Smith M.E. (2013) Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biology Reviews*, 27, 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.09.001>
- Tedersoo L., Bahram M., Pöhlme S., Kjøljalg U., Yorou N.S., Wijesundera R., Ruiz L.V., Vasco-Palacios A.M., Thu P.Q., Suija A. (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346, 1256688.
- Tedersoo L., Brundrett M.C. (2017) Evolution of ectomycorrhizal symbiosis in plants. In: *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*. Tedersoo L. editor. Springer, pp. 407–467.
- Tedersoo L., Sánchez-Ramírez S., Kõljalg U., Bahram M., Döring M., Schigel D., May T., Ryberg M., Abarenkov K., (2018) High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*, 90. Doi: 10.1007/s13225-018-0401-0
- Teste F.P., Jones M.D., Dickie, I.A. (2020) Dual-mycorrhizal plants: their ecology and relevance. *New Phytologist*, 225, 1835–1851.
- van der Heijden M.G.A., Bardgett R.S., Straalen N.M. (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11, 296–310.
- Vanegas-Léon M. (2017) Ectomicorrizas tropicais: estudos de casos na Mata Atlântica. 78 pp. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. Florianópolis, 24 de Março de 2017, CAPES.
- Vanegas-Léon M., Sulzbacher M.A., Rinaldi A.C., Roy M., Selosse M-A., Neves M. A. (2019) Are Trechisporales ectomycorrhizal or non-mycorrhizal root endophytes? *Mycological Progress*, 18, 1231–1240.
- Vasco-Palacio A.M. (2016) Ectomycorrhizal fungi in Amazonian tropical forests in Colombia. Tese de Doutorado. Fungal Biodiversity Centre (CBS) and Utrecht University. Editorial Panamericana, Bogotá, Colombia.
- Viana V.M., Tabanez A.A.J., Batista J.L.F. (1997) Dynamics and restoration of forest fragments in the Brazilian Atlantic moist forest. In: *Tropical Forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities*. Laurance W.F., Bierregard Jr. R.O. (Eds.) University of Chicago Press, Chicago, Illinois, pp. 351–365.
- Vrålstad T., Fossheim T., Schumacher T. (2000) *Piceirhiza bicolorata* – the ectomycorrhizal expression of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate? *New Phytologist*, 145, 549–563.
- Woehl Jr.G., Nishimura W.E., Kamchen S. (2008) Mata Atlântica: essencial para a vida. Instituto Rã-bugio para Conservação da Biodiversidade. Cartilha. ISBN 978-85-61891-02-2.
- Zhang Y.C., Zou Y.N., Liu L.P., Wu Q.S. (2019) Common mycorrhizal networks activate salicylic acid defense responses of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 61, 1099–1111.

APÊNDICE A – Ilustrações das características dos mantos ectomicorrízicos

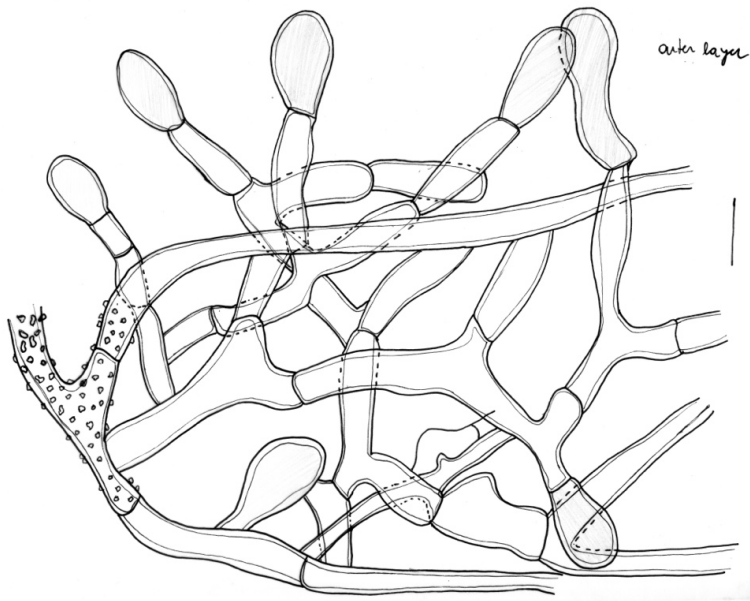
*Amanita viscidolutea* (morfotipo M70)



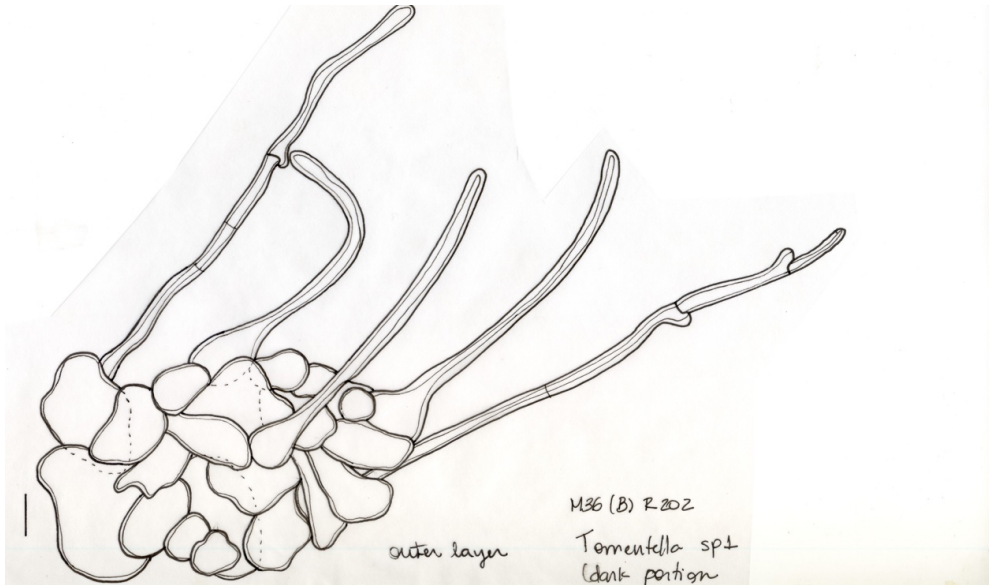
*Austroboletus festivus* (morfotipo M41)

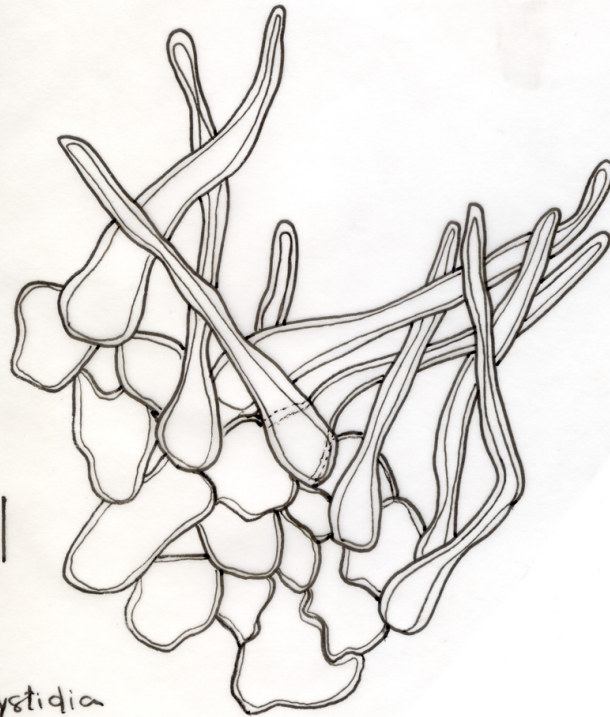


M41(C)R210 - A. tortuosus



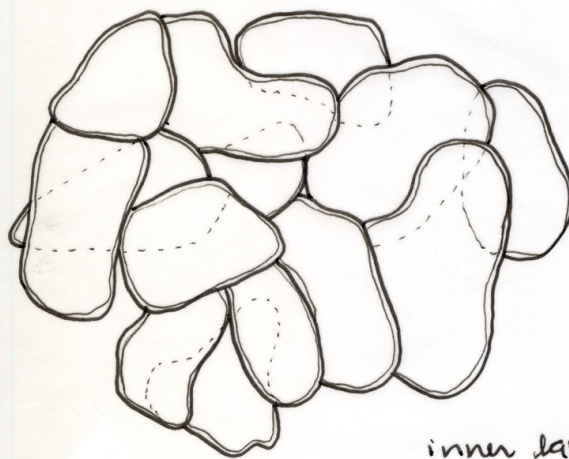
*Tomentella* sp1 (morfortipo M36)





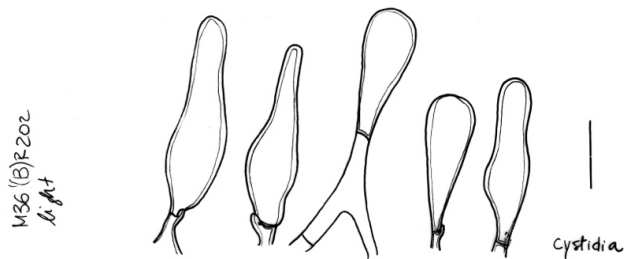
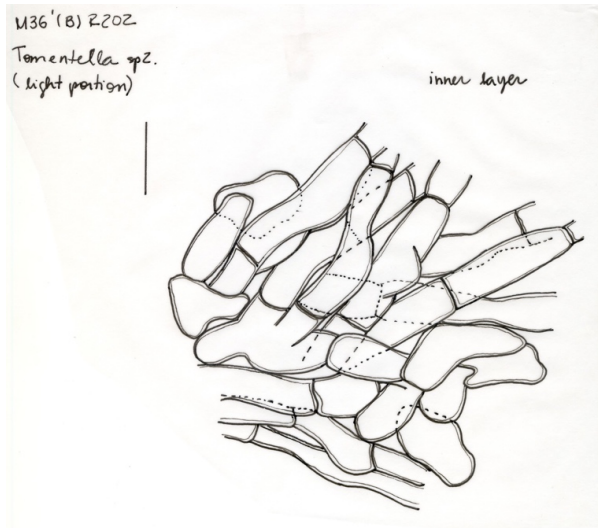
cystidia

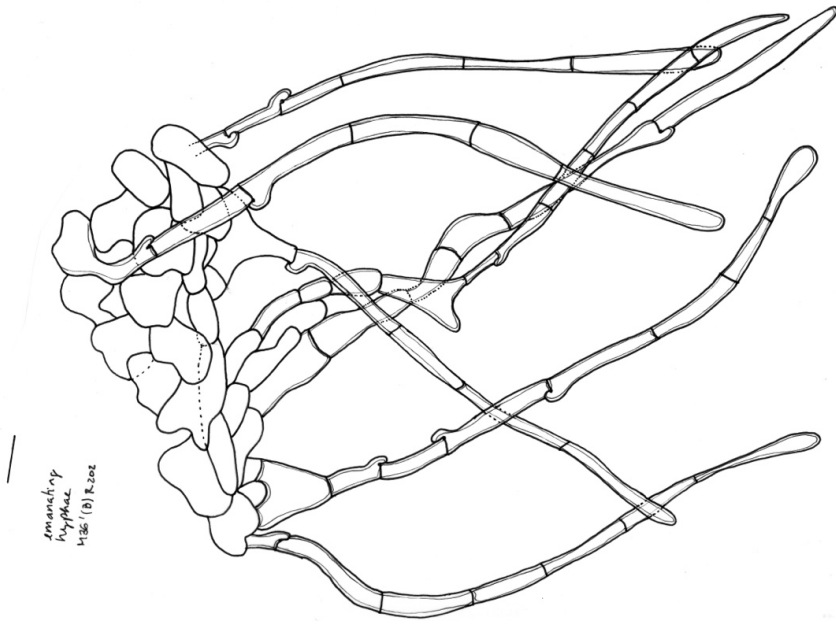
M36(B)R202 Tomentella sp!  
dark portion



inner layer

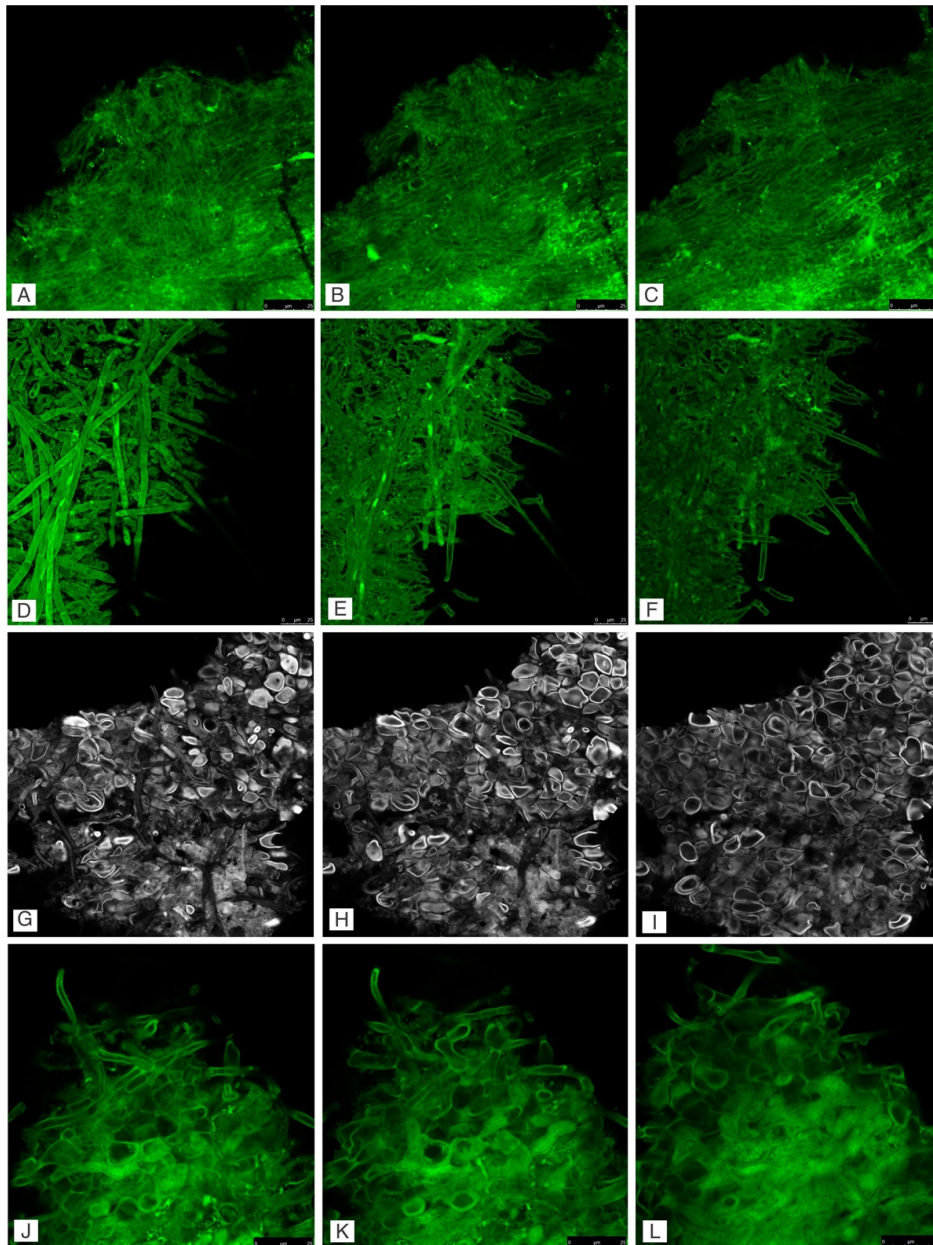
*Tomentella* sp2 (morfortipo M36')





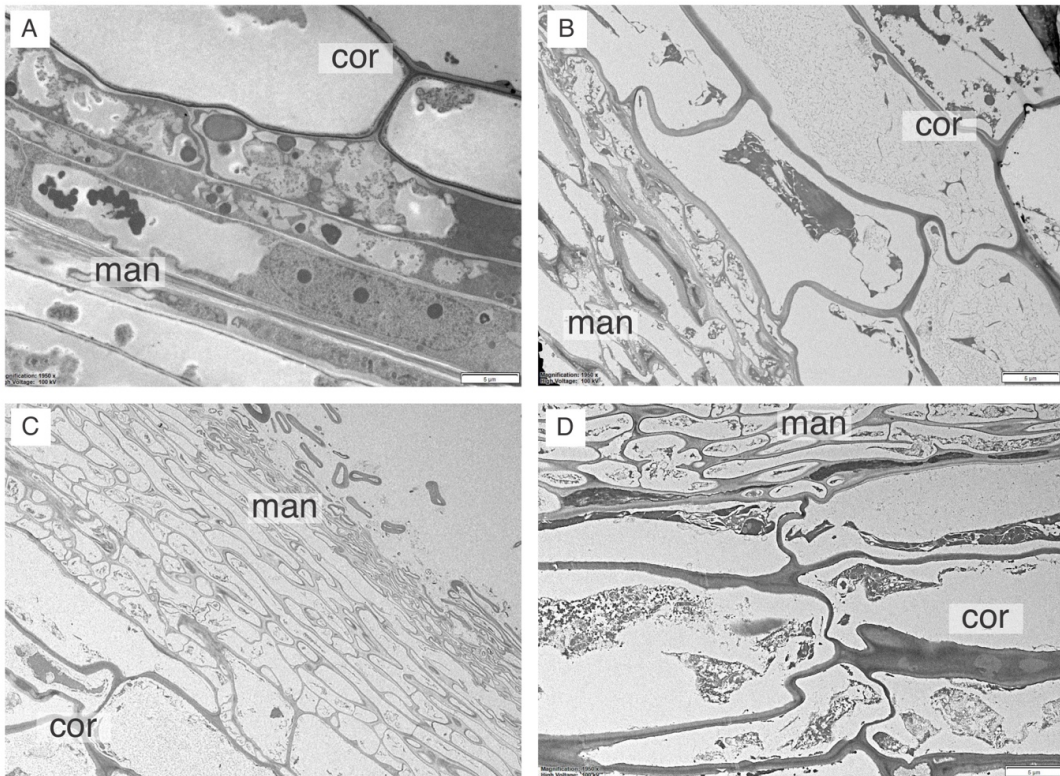
## APÊNDICE B – Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Ectomicorrizas de *Guapira opposita* com *Amanita viscidolutea* (A–C), *Austroboletus festivus* (D–F), *Tomentella* sp1. (G–I) e *Tomentella* sp2. (J–L). Visão das camadas externa (A, D, G e J), mediana (B, E, H, K) e interna (C, F, I, L) dos mantos ectomicorrízicos de cada espécie.



### APÊNDICE C – Microscopia Eletrônica de Transmissão

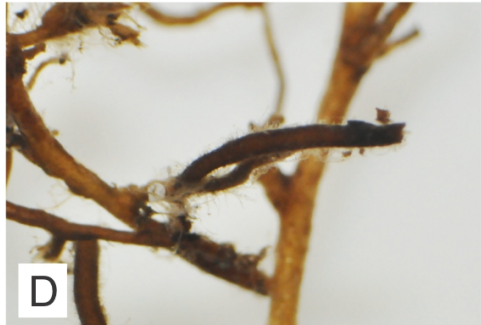
Secção longitudinal das ectomicorrizas de *Guapira opposita* com *Amanita viscidolutea* (A), *Austroboletus festivus* (B), *Tomentella* sp1. (C) e *Tomentella* sp2. (D) demonstrando a formação de mantos ectomicorrízicos conspícuos, com as particularidades de cada espécie, sem estabelecimento da rede de Hartig ou de hifas intraradiculares.





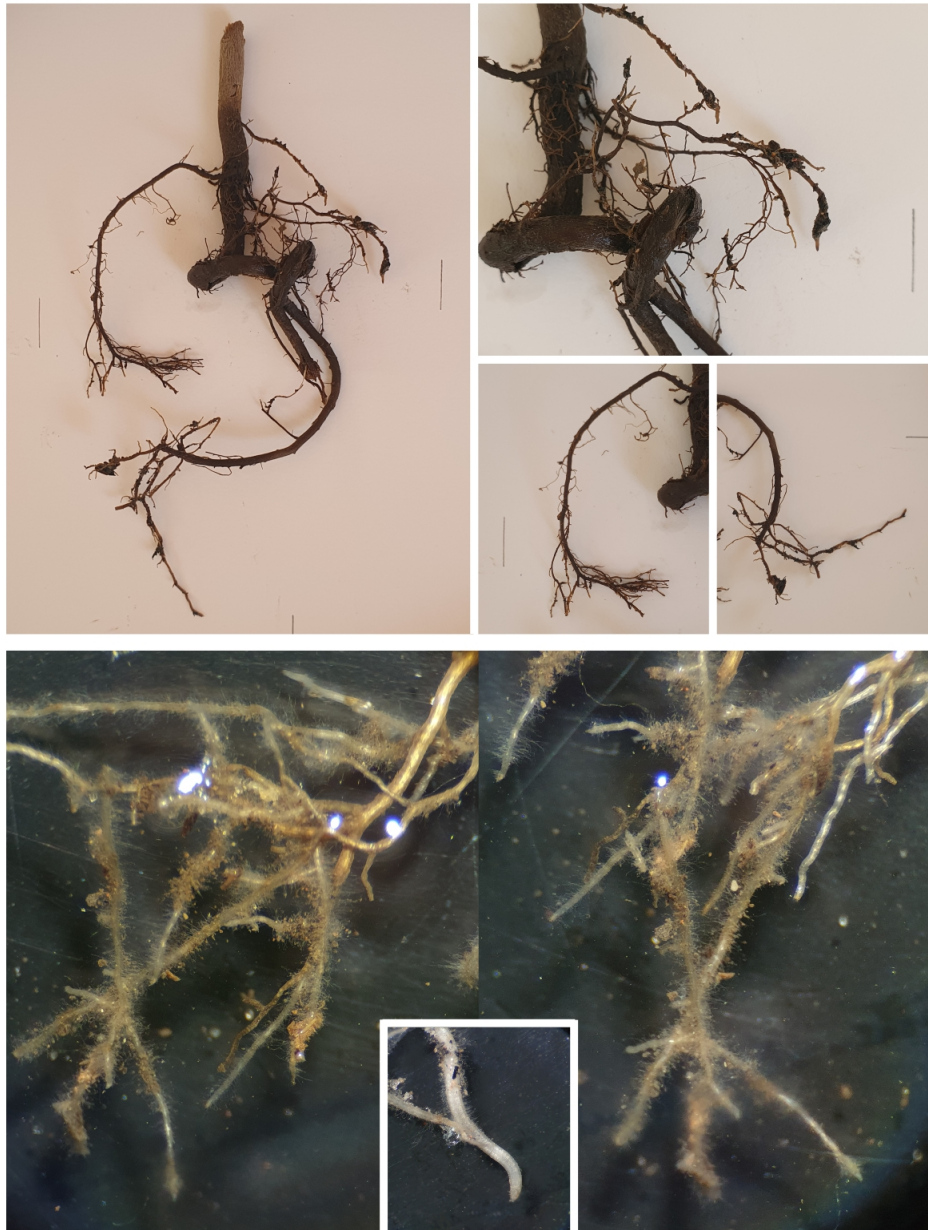
## APÊNDICE D – Morfotipos sem simbiote vegetal determinado

**Morfotipos coletados na restinga da Ilha de Santa Catarina. A. M26**, Sistema micorrízico simples, não ramificado, sistema de exploração de média distância, subtipo *fringe*. Superfície do manto frequentemente fibrosa, levemente algodonosa, marrom claro na porção próxima e branca na porção distal. Rizomorfos presentes, relativamente abundantes, amarelo queimado. Cordões hifais marrons formados a partir de elementos extraradiculares. **B. M35**, Sistema micorrízico simples, não ramificado, sistema de exploração de contato. Superfície do manto algodonosa, marrom claro com algumas projeções prateadas. Rizomorfos ausentes. **C. M44**, Sistema micorrízico simples, não ramificado, sistema de exploração de média distância, subtipo liso. Superfície do manto frequentemente fibrosa, às vezes algodonosa, amarelo a marrom-oliva. **D. M46**, Sistema micorrízico simples, não ramificado, sistema de exploração de contato. Superfície do manto densa, espinhosa, marrom escura. Hifas extraradiculares frequentes na porção proximal dando a aparência lanosa. **E. M61**, Sistema micorrízico monopodial pinado a frequentemente dicotômico, sistema de exploração de contato. Superfície do manto densa, marrom escura, criando zonas sem manto na raiz. **F. M62**, Sistema micorrízico simples, não ramificado, sistema de exploração de contato. Superfície do manto densa, uniforme, branca brilhosa, prateada. **G. M69**, Sistema micorrízico irregularmente pinado, ramificado, sistema de exploração de contato. Superfície do manto densa, uniforme, castanho claro, com porções prateadas da qual parte micélio extraradicular hialino.



**APÊNDICE E – Morfologia da raiz de *Guapira opposita* sem e com manto ectomicorrízico**

Sistema radicular de *G. opposita* **sem** associação com fungos ectomicorrízicos. O sistema radicular se ramifica repetidamente, formando um sistema pinado monopodial, ramificado até a 3ª ordem; a raiz apresenta uma superfície ligeiramente fibrilosa, brilhante, vermelha amarelada quando jovem, tornando-se muito vermelha com a idade. A zona pilífera é visivelmente bem desenvolvida.

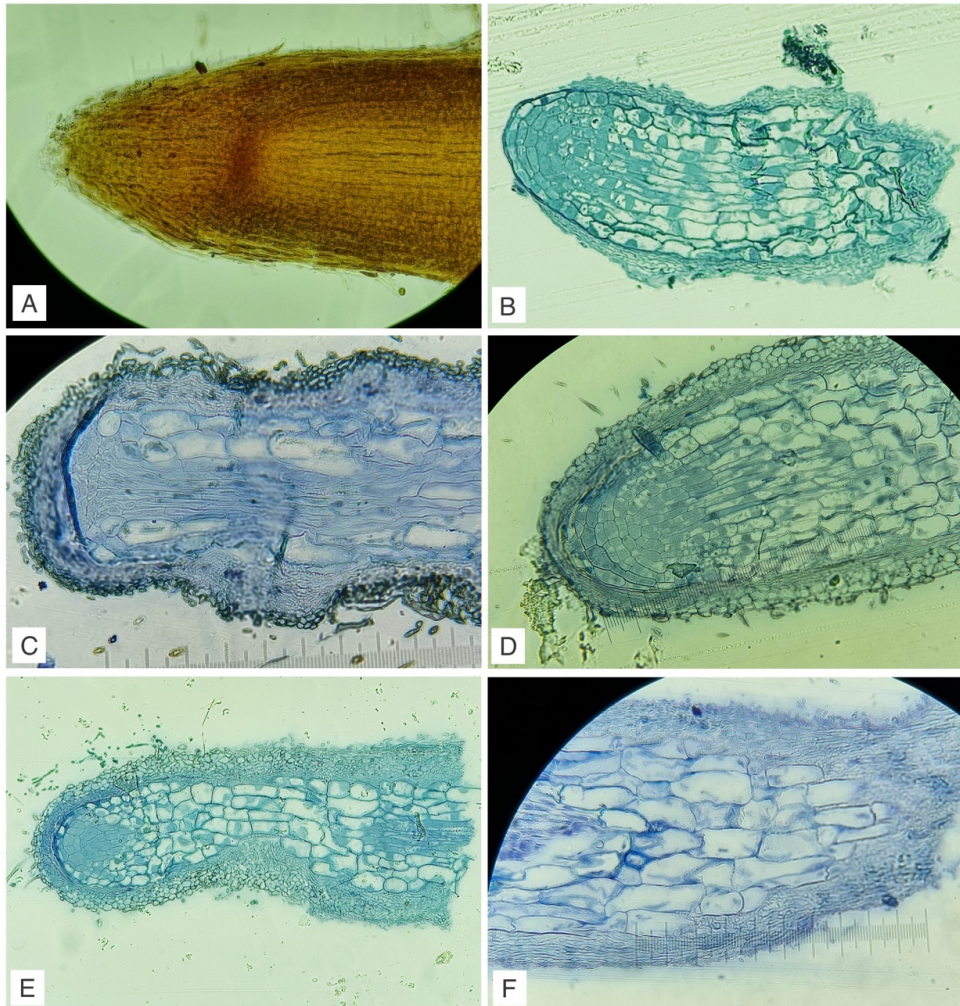


Sistema radicular de *G. opposita* com associação com fungos ectomicorrízicos O sistema radicular ramifica até 4ª e 5ª ordem e a superfície adquire a coloração e constituição equivalentes ao manto micorrízico característico de cada táxon associado. As ectomicorrizas encontradas formam um manto conspícuo, não apresentam uma rede de Hartig ou outra estrutura de transferência intraradicular. O crescimento da zona pilífera é bloqueado, embora seja possível observar em alguns casos a presença de pelos radiculares em zonas onde o manto ectomicorrízico é inconspícuo.



## APÊNDICE F – Microscopia Óptica de Luz

Pontas de ectomicorrizas em visão longitudinal. Raiz de *G. opposita* sem manto ectomicorrízico (A). É possível observar a presença da coifa cobrindo a ponta da raiz, o meristema apical com células pequenas e indiferenciadas, o meristema fundamental e parte da protoderme. Quando associada a *Amanita viscidolutea* (B), *Austroboletus festivus* (C), *Tomentella* sp1 (D), *Tomentella* sp1 + *Tomentella* sp2 (E) e *Tomentella* sp2 (F), a raiz de *G. opposita* apresenta uma estrutura de crescimento secundário, com um córtex bem desenvolvido e a presença de um cilindro vascular, ainda que o meristema apical apresente células com características intermediárias entre indiferenciadas e diferenciadas. É possível observar a ausência da coifa e da camada epidérmica da raiz. As hifas fúngicas se restringem ao manto estabelecido na superfície da raiz, não existe a formação da rede de Hartig ou de qualquer projeção intraradicular.



**ANEXOS A – Fixação e inclusão de amostras para microscopia eletrônica de transmissão, modificado de Moore et al. (1991)**

Etapa 1 – Fixação

As pontas das raízes foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão PBS 10 mM (pH 7,2) à 4 °C, *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram lavadas com o mesmo tampão, duas vezes, por 10min cada, à temperatura ambiente. Após a lavagem com o mesmo tampão, as pontas das raízes foram desidratadas (a seguir).

Etapa 2 – Desidratação alcoólica

Pureza	Tempo	Temperatura
<b>Etanol</b> <b>30%</b>	15 min	Temperatura ambiente
<b>Etanol</b> <b>50%</b>	15 min	Temperatura ambiente
<b>Etanol</b> <b>70%</b>	15 min	Temperatura ambiente
<b>Etanol</b> <b>90%</b>	15 min	Temperatura ambiente
<b>Etanol</b> P.A.	20 min	Temperatura ambiente
<b>Etanol</b> P.A.	20 min	Temperatura ambiente

Etapa 3 – Inclusão em resina LR White (Polysciences Inc., Warrington, PA)

As pontas das raízes foram infiltradas seguindo as proporções abaixo. Antes de iniciar a última etapa de inclusão, é necessário ligar a estufa a 60 °C.

	vol/vol	Tempo	Temperatura
Resina : Etanol	1 : 3	1 hora	Temperatura ambiente
Resina : Etanol	1 : 1	1 hora	Temperatura ambiente
Resina : Etanol	3 : 1	1 hora	Temperatura ambiente
Resina		<i>overnight</i>	4 °C
Resina		ca. 2 horas	Temperatura ambiente

Etapa 4 – Fase final de inclusão e polimerização

- 1) Colocar em um vidro de relógio um pouco de resina (usada) para deixar temporariamente, o sistema ectomicorrízico;
- 2) Selecionar as *tips* de interesse e cortá-las do sistema;
- 3) Posicionar as cápsulas em uma raque de maneira que fiquem fixas. Adicionar a resina pura e colocar as *tips* em cada cápsula;
- 4) Sob o estereomicroscópio, e com auxílio de agulhas, posicionar a *tip* no centro do fundo da cápsula;
- 5) Adicionar mais algumas gotas de resina pura e fechar cuidadosamente a cápsula;
- 6) Incubar as amostras numa estufa a 60 °C, *overnight*, para concluir a etapa de polimerização.

Moore P.J., Swords K.M.M., Lynch M.A., Staehelin L.A. (1991) Spatial organization of the assembly pathways of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. *The Journal of Cell Biology*, 112: 589-602.

#### **ANEXO B – Protocolo de Extração de DNA utilizando DNeasy® Plant Mini Kit**

Notas antes de iniciar:

- Fazer todas etapas de centrifugação a temperatura ambiente (15-25°C);
- Se necessário, redissolva qualquer precipitado no "Buffer AP1" e "Buffer AW1" concentrados;
- Adicione etanol aos "Buffer AW1" e "Buffer AW2" concentrados;
- Pré-aqueça o banho-maria (ou banho-seco) a 65°C.

1. Macere as amostras usando ( $\leq$  100 mg peso seco ou  $\leq$  20 mg de tecido liofilizado) usando o TissueRuptor®, TissueLyser II, ou no cadinho;

2. Adicione 400  $\mu$ l Buffer AP1 e 4  $\mu$ l RNase A. Vórtez e incube por 10 min a 65°C. Inverta o tubo 2-3 vezes durante a incubação.

Nota: Não misture o Buffer AP1 e RNase A antes do uso!

3. Adicione 130  $\mu$ l de Buffer P3. Mix e incube no gelo por 10 min;

4. Recomendado: Centrifugue o lisado por 5 min a 20.000 xg (14.000 rpm);

5. Pipeta o lisado no "QIAshredder spin column" localizado em um tubo de 2 ml ("2 ml collection tube"). Centrifugar por 2 min a 14.000 rpm;

6. Transferir o líquido para um novo tubo sem perturbar o pellet, caso presente. Adicione 1.5 volumes de Buffer AW1, mix pipetando. Exemplo: se você tem 450 µl lisados, adicione 675 µl de Buffer AW1. Um precipitado pode se formar após a adição do buffer, mas isso não alterará o procedimento de DNeasy.

Nota: É importante pipetar o buffer diretamente no lisado e misturar imediatamente.

7. Transfira 650 µl da mistura para o "DNeasy Mini spin column" localizado em um tubo de 2 ml ("2 ml collection tube"). Centrifugue por 1 min a 6.000 xg ( $\geq 8.000$  rpm). Descarte o líquido. Repita essa etapa com a amostra remanescente;

8. Transfira a "spin column" para um novo tubo de 2 ml collection tube. Adicione 500 µl de Buffer AW2, e centrifugue por 1 min a 6.000 xg. Descarte o líquido;

9. Adicione mais 500 µl de Buffer AW2. Centrifugue por 2 min a 20.000 xg (14.000 rpm).

Nota: Remova a spin column do tubo cuidadosamente de forma que a coluna não entre em contato com o líquido.

10. Transfira a spin column para um novo tubo de 1.5 ml ou 2 ml;

11. Adicione 50 µl de Buffer AE para eluição. Incube por 5 min a temperatura ambiente (15-25°C). Centrifugar por 1 min a 6.000 xg ( $\geq 8.000$  rpm);

12. Repita o passo 11.

### ANEXO C – Preparo da solução BSA (20mg/mL)

Etapa 1 – Preparo do tampão PBS (*phosphate-buffered saline*)

Reagente	g (solução 1X)	Concentração final (1X)	g (solução estoque 10X)	Concentração final (10X)
----------	----------------	-------------------------	-------------------------	--------------------------



NaCl	8 g	137 mM	80 g	1.37 mM
KCl	0.2 g	2.7 mM	2 g	27 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g	10 mM	14.4 g	100 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g	1.8 mM	2.4 g	18 mM

Se necessário, PBS pode ser suplementado com o seguinte:

CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.133 g	1 mM	1.33 g	10 mM
MgCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0.10 g	0.5 mM	1.0 g	5 mM

PBS pode ser feito como uma solução 1X ou como uma solução estoque 10X. Para preparar 1 L de PBS 1X ou 10X, dissolva os reagentes listados acima em 800 mL de H<sub>2</sub>O. Ajuste o pH para 7.4 (ou 7.2, se necessário) com HCl, e então adicione H<sub>2</sub>O até completar 1 L. Separe a solução em alíquotas e esterilize elas autoclavando por 20 min a 15 psi (1.05 Kg/cm<sup>2</sup>) ou através esterilização de filtro. Armazene o PBS em temperatura ambiente.

#### Etapa 2 – Preparo da albumina bovina

Foi utilizado o tampão PBS 1x (ph 7.4) preparado no dia 30 de outubro de 2018, e complementado com mais KCl.

	Para 10 mL
EDTA	0.0029 g
KCl	0.0724 g
BSA	0.200 g
Glicerol	3 mL

Misturar EDTA e KCl e dissolver em 7 mL de PBS. Autoclavar e quando a temperatura ambiente for alcançada, adicionar BSA e glicerol.

BSA 20 mg/mL:

EDTA	1 mM
KCl	100 mM
BSA	20 mg/mL
Glicerol	30%

O preparo de BSA foi feito a partir das especificações do produto produzido e vendido pela ThermoFischer (20mg/mL BSA supplied in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25 °C); 100 mM; KCl; 1 mM EDTA; 50% (v/v) glycerol).

Atenção: Foi usado tampão PBS ajustado ao invés de Tris-HCl. O BSA utilizado estava vencido desde 2003 (e talvez tenha sido o segredo do sucesso), e estava sendo armazenado a temperatura ambiente e não entre 0 e 5 °C como indicação do fabricante. No entanto, a albumina apresentava coloração e consistências normais.

#### **ANEXO D – Protocolo de Purificação de Produto de PCR utilizando PEG**

As quantidades entre parênteses devem ser utilizadas para purificar produtos de PCR direta, de tal forma que o purificado seja ressuspensionado em 50µl, ao invés de 25µl.

1. Adicionar o mesmo volume de PEG 20% para volume de DNA (produto de PCR) - 25µl. (50µl)

Nota: Sempre limpar a ponteira no vidro de PEG, tirando o excesso do produto, pois é muito viscoso.

2. Incubar 30 min em banho-maria a 37°C (ou em termociclador);

3. Centrifugar 15 min a 13.000 rpm;

4. Descartar o sobrenadante com a pipeta, deixando sempre o fundinho;

5. Adicionar 125 µl de etanol 80% gelado; (250µl etanol 80%)

6. Centrifugar por 5 min a 13.000 rpm;

7. Descartar o líquido com a pipeta;

8. Repetir a limpeza (etapas 5 e 6) com etanol 95% e centrifugar. Retirar sobrenadante; (250µl etanol 95%)

9. Secar a temperatura ambiente até que não haja vestígios de etanol (pode deixar overnight ou utilizar o banho-seco - 30 min a 40°C).

Nota: Para acelerar o processo, após seco, é possível ressuspender em água e deixar as amostras durante 10 min a 30°C. Também é possível secar no termociclador, com a tampa aberta, por 10 min, a 94 °C.

10. Ressuspender em 25 µl água Miliq (água ultrapura) ou tampão TE. (50µl)